CYTOSOLISCHE SELENOPROTEINE DER MÄUSELEBER

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HASAN SAFAYHI

aus Istanbul

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543928_0118

CYTOSOLISCHE SELENOPROTEINE DER MÄUSELEBER

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HASAN SAFAYHI
aus Istanbul

1986

Tag der mündlichen Prüfung	: 17. März 1986
Dekan	: Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter	: Prof. Dr. A. Wendel
2. Berichterstatter	: Prof. Dr. U. Weber

Diese Arbeit wurde am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. A. Wendel durchgeführt.

Herrn Prof. Wendel danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für sein unermüdliches Engagement für die Bereitstellung der Mittel, die diese Arbeit letztendlich möglich gemacht haben.
Meinem Laborkollegen, Herrn Diplom-Biochemiker Rainer Otter, danke ich für seine Hilfsbereitschaft und insbesondere für seinen Einsatz für das Wohl unserer Versuchstiere, und ich hoffe, daß auch er unsere nicht immer leise Zusammenarbeit in guter Erinnerung behält.
Besonderer Dank gilt Frau Martina Fausel für ihre mitdenkende technische Assistenz.
Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. U. Weber, insbesondere meinen Kollegen, den Herren Diplom-Biochemiker A. Deger, R. Rapp, D. Rückert und H. Krämer, deren Geduld ich mit der Belegung des Counters und der Autoradiographie-Kassetten auf langwierige Proben stellen durfte, möchte ich für ihre immer gutgelaunte Hilfsbereitschaft danken.
Schließlich bin ich allen Angestellten des Physiologisch-Chemischen Instituts, die hier ungenannt bleiben, aber ohne deren Unterstützung sich diese Arbeit schwieriger gestaltet hätte, zu Dank verpflichtet.

A B S T R A C T

Safayhi, Hasan

C Y T O S O L I S C H E S E L E N O P R O T E I N E D E R M Ä U S E L E B E R

Bei männlichen NMRI han-Mäusen wurde mit einer Selenmangel-Diät (Se<10 ppb) ein chronischer Selenmangel hervorgerufen. Die Aktivität der Selen-abhängigen Glutathion - Peroxidase (Se-GPx) sank nach 60 tägiger Diätierung gegenüber mit 0,35 ppm Selen supplementierten gleichaltrigen Kontrollen unter 1 %.Die Glutathion-S-Transferase-Aktivität mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol erhöhte sich auf 200 %. Nach 120 Tagen stieg diese Aktivität auf 300 %, während bei der Se-GPx-Aktivität auf niedrigem Niveau keine signifikante Veränderung mehr zu beobachten war. Die Laktat-Dehydrogenase-Aktivität der Mangeltiere war auf 80% gesunken.Die Leber-/Körpergewichts-Relation, die zunächst zuungunsten der deficienten Mäuse lag, entwickelte sich mit zunehmender Dauer der Diätierung ca.ab dem 90.Tag zu ihren Gunsten. Bei Mäusen, die 90 Tage oder länger mit der Selen-deficienten Diät ernährt worden waren, führte die i.p.Applikation einer Tracerdosis 75Se-Natriumselenit (10 µg Se/kg) nach einer Markierungsdauer von 6 h gegenüber gleichaltrigen Kontrollen zu signifikant erhöhter 75Se-Aktivitätswiederfindung in der Leber und in 105 000 g Niederschlägen,während die Gamma-Aktivität in den 105 000 g Überständen der deficienten Lebern auf Protein bezogen nicht-signifikant erhöht war. Die Verteilung der 75Se-Aktivität auf die cytosolischen Proteine,die mittels FPLC-Ionenaustauscher-Chomatographie nach ihrer Ladung bzw. mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese nach der Größe ihrer Untereinheiten getrennt wurden, wies markante vom Selenstatus-abhängige Unterschiede auf.Die Markierungsdauer von 3 bis 48h hatte keinen Einfluß auf das Verteilungsmuster. Bei Se-adäquaten Tieren wurde Se-GPx-Untereinheit (23 kDa) am stärksten markiert und bei Anionenaustausch-Trennung als die präzipitierbare Hauptradioaktivitätsbande mit der Se-GPx-Aktivität eluiert.Während die in dieses Protein eingebaute 75Se-Aktivität bei Mangeltieren abnahm, wurde als 'Selen-Mangel-indikatorprotein' eine Komponente mit 54 kDa stärker radioaktiv markiert. Bei Doppelmarkierungen mit 14C-Leucin und 75Se-Natriumselenit fand sich parallel zur 75Se-Aktivität spezifisch mehr 14C-ß-Aktivität in der 54 kDa Fraktion. Der 75Se-Einbau in diese Fraktion ließ sich in vivo durch 2 malige Gabe von Cycloheximid (83 mg/kg) hemmen. Als weitere Proteine, die bei limitiertem Se-Angebot mit der Se-GPx um das Spurenelement konkurrieren, wurden Polypeptide mit Molgewichten von 12, 20 und 48 kDa nachgewiesen.

I N H A L T S A N G A B E

1. Einführung

1.1. Die Bedeutung des Elementes für den Säugetierorganismus
1.2. Molekulare Grundlagen der Selenmangelsymptome
1.3. Selenoproteine im Lebercytosol
1.4. Zur Problematik des experimentellen Selenmangels im Tiermodell

2. Problemstellung

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien
3.1.1. Chemikalien
3.1.2. Geräte
3.1.3. Spezielles Zubehör und spezielle Verbrauchsmaterialien
3.1.4. Tiere und Tierfutter
3.2. Methoden
3.2.1. Tierhaltung
3.2.2. Radioisotopenmarkierung
3.2.2.1. Proteinmarkierung mittels (75Se)-Natriumselenit
3.2.2.2. Proteinmarkierung mittels L-(U-14C)-Leucin
3.2.2.3. Doppelmarkierung mit (75Se)-Natriumselenit und L-(U-14C)-Leucin
3.2.2.4. Messung der Radioaktivität und Quantifizierung
3.2.3. Aufarbeitung der biologischen Proben

3.2.4. Säulenchromatographie (FPLC)
3.2.4.1. Ionenaustausch-Chromatographie
3.2.4.2. Gelfiltrations-Chromatographie
3.2.5. Elektrophorese
3.2.6. Biochemische Analytik
3.2.7. Statistische Bewertung der Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1. Tiere und Selenstatus
4.1.1. Körpergewicht und Lebermasse
4.1.2. Selenstatus
4.2. Fraktionierte Zentrifugation
4.3. Quantifizierung der 75Se-Gamma-Aktivität in der Mäuseleber
4.3.1. 75Se-Aktivität in den Leberhomogenaten
4.3.2. 75Se-Aktivität in den zellulären Fraktionen
4.4. Radioaktivitätseinbau in 105 000 g Überstand-Proteine
4.4.1. Nachweis von 75-Se-markierten Proteinen in der löslichen Fraktion mittels SDS-PAGE
4.4.2. Säulenchromatographische Trennung der 105 000 g Überstände
4.4.2.1. Ionenaustausch-Chromatographie in vivo markierter Überstände
4.4.2.2. Versuch der Hemmung des Einbaus von 75Se-Aktivität in 105 000 g Überstand-Proteine durch Cycloheximid
4.4.2.3. Ionenaustauschchromatographie in vitro markierter Überstände
4.4.2.4. Molekularsieb-Chromatographie
4.4.3. L-(U-14C)-Leucin markierte 105 000 g Überstände

4.4.4. Ermittlung der Beta-Aktivität doppelmarkierter Ansätze
4.4.5. (75Se)-Natriumselenit und (U-14C)-Leucin doppelmarkierte 105 000 g Überstände
4.4.6. SDS-PAGE von 75Se-markierten und angereicherten Ionenaustausch-Fraktionen

5. Diskussion

5.1. Zum Selenstatus der Tiere
5.2. Spezifische Markierung von Selenoproteinen mit 75Se-Natriumselenit
5.3. Detektion der Radioaktivität in biologischen Proben
5.4. 75Se-Aktivität in den Lebern und zellulären Fraktionen
5.5. Hypothesen zur Stoffwechselregulation durch Selen

6. Literatur

A B K Ü R Z U N G E N:

BSA	Rinderserumalbumin
tBOOH	tert. Butylhydroperoxid
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzol
CHI	Cycloheximid
CuOOH	Cumolhydroperoxid
DCNB	1,2-Dichloro-4-nitrobenzol
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraacetacetat
EOC	Ethoxycoumarin
FPLC	Schnelle Säulenchromatographie
GSH	Glutathion (reduziert)
GST	Glutathion-S-Transferasen
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
i.p.	Intraperitoneale Applikation
LDH	Lactat Dehydrogenase
LPO	Lipid-Peroxidation
LT's	Leukotriene
OA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
PG's	Prostaglandine
PIP	Peroxidation Inhibiting Protein
PLA2	Phospholipase A2
PMNL	Polymorphonucleare Leukocyten
p.o.	Per orale Applikation
ppb	Parts per billion
ppm	Parts per million
SDS	Natriumdodecylsulfat
Se+	Selen-supplementierte Tiere
Se-	Selenmangeltiere
Se-GPx	Selenhaltige Glutathionperoxidase
Non-Se-GPx	Selenunabhängige Glutathionperoxidase
THETE	Trihydroxyeicosatetraen ('Lipoxin')
UE	Untereinheit

1. E I N L E I T U N G

1.1. Die Bedeutung des Elementes für den Säugetierorganismus

Selen, im Jahre 1817 von Berzelius als Element entdeckt (1), in den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts als toxisch (2,3) in den vierzigern als Carcinogen verteufelt(4),in den fünfzigern schließlich als essentiell erkannt(5), begegnet uns heute in den Vereinigten Staaten als freiverkäuflicher 'Gesund-, Fit- und Jungmacher', der u.a. vor Herz- und Kreislaufkrankheiten, sowie vor Krebs schützen soll. Eine der Ursachen dieses widersprüchlichen Bildes der Wirkungen von Selen und der wundersamen Wandlung ihrer Einschätzung liegt in der spät entdeckten engen "therapeutischen Breite" dieses Elementes: Ca. 50 bis 2000 ppb in der Diät (6); die chronisch toxischen Effekte oberhalb dieser Dosis werden sichtbar, wenn Selen der Ratte in der Nahrung in Form von Selenit bzw. Selenat zugeführt wird (7). Der Selenbedarf des erwachsenen Menschen wird auf 50 bis 200 µg/Tag geschätzt (94, 95).
Folgende Symptome oder Krankheitsbilder mangelnder Versorgung mit dem Spurenelement halfen das neue freundlichere Image von Selen zu schaffen:

- Wachstumshemmung bei Mikroorganismen (8),
- ernährungsbedingte Necrosen der Leber bei Ratten (5) und Mäusen (9),
- Exudative Diathese (10, 11) und Pankreas-Atrophie beim Geflügel (12),
- die 'white muscle disease'genannte Muskel-Atrophie bei Schafen (13) und Kälbern (14),
- die als 'Keshan disease' bekannte Cardiomyopathie beim Menschen (15, 96, 97),
- die nach ihren Entdeckern 'Kashin - Beck' genannte Krankheit beim Menschen, deren beschriebene Symptome

Gelenkdeformationen und Knochenwachstumsstörungen sind (16),
- Kataraktbildung an der Linse der Ratte (17),
- Haarausfall bei Ratten (17, 18),
- Aspermatogenese bei Ratten und Mäusen (17,19).

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß verschiedene Organe unterschiedliche Pathophysiologie im Selenmangel zeigen, die sich zudem spezies-spezifisch unterschiedlich ausprägt.

1.2 Molekulare Grundlagen der Selenmangelsymptome

Selenmangel im Tiermodell hat vielfältige Einflüsse auf verschiedene Stoffwechselwege und Enzymaktivitäten:
Verlangsamt werden die Lipid/Vitamin E Absorption beim Huhn (22) und die Entgiftung von Schwermetallen (23-25).Postuliert ist eine Modulation des mitochondrialen Substratumsatzes in der Rattenleber (20, 21). Vermindert sind die Cytochrom-P450 Induktion durch Phenobarbital bei Ratte und Huhn (26-28) und die Stabilität von Lysosomen des Lamms (29). Phospholipide (30), Vitamin E (31), Häm (32), Glucose (30) und Glutathion (33) werden bei der Ratte schneller umgesetzt.
Die Aktivitäten der Se-GPx bei Mensch, Ratte, Maus, Huhn und Lamm (34) und der Ferrochelatase bei der Ratte (35) werden erniedrigt, während die der GSH-S-Transferasen bei Ratte und Maus (36, 37), der γ-Glu-Cys-Synthetase (33), der Hämoxygenase (35,32), der δ-Aminolävulinsäure-Synthetase (32), der δ-Aminolävulinsäure-Dehydrogenase (35) und der Epoxidhydrolase (38) sich bei der Ratte erhöhen.

Die Entdeckung des Enzyms 'Glutathionperoxidase (Se-GPx)' im Jahre 1957 (39) und der Nachweis, daß dieses Protein Selen in ihrem katalytischen Zentrum (40), und zwar als Selenocys-

tein (42), enthält, lenkte die Aufmerksamkeit auf die Bedeutung dieses Spurenelementes für das Schutzsystem der Zelle vor Schäden, die von reaktiven Metaboliten des Sauerstoffs hervorgerufen werden können. Die Se-GPx von Rindererythrocyten ist ein gut untersuchtes tetrameres Protein mit einem Molekulargewicht von 84 kDa, dessen identische 4 Untereinheiten je 1 g Atom Se enthalten (41). Bekannt sind Kinetik (44), Aminosäuresequenz (43) und Substratspezifität des Enzyms aus den Rindererythrocyten (45).

Die Bilanzierung der Selenmenge in diesem Protein gegenüber dem Gesamtgehalt der Gewebe und der Zellen an diesem Spurenelement deuteten daraufhin, daß dieses Element in weitere biologische Strukturen eingebaut wird (46).
Weitere Selen-einbauende Proteine sind in verschiedenen Wirbeltieren meist durch Radioisotopenmarkierung nachgewiesen worden (vgl. 1.4.). Jedoch sind lediglich von PIP, einem der Se-GPx funktionell-verwandten Protein, gereinigt aus den Lebern der Ratte und des Schweins (47) und aus dem Herzen des Schweins (48),und dem Selenoflagellin, einem Strukturprotein im Spermamittelteil (49), die Funktion in Ansätzen bekannt.

R. Reiter und A. Wendel haben am definierten Selenmangel-Modell an Albinomäusen gezeigt, daß die Verfütterung einer Diät,die ≤10 ppb Selen enthält, in der Leber zunächst zu einer schnellen Se-GPx-Aktivitätsabnahme mit einer Halbwertszeit von 74 Stunden führt.Nach 2 Wochen bleibt eine Restaktivität der Se- GPx von ca. 5 %, während die GSH-S-Transferasen und die Cytochrom-P450-Hydroperoxidase moderat erhöhte Aktivitäten um 120 % aufweisen. Mit der dritten Woche der Depletion setzen drastische synchron verlaufende Auslenkungen der Phase I und Phase II Enzymaktivitäten des Fremdstoffwechsels ein, die ca. nach 40 Tagen abgeschlossen sind und folgendes Bild bieten (50,51):

Erniedrigte Enzymaktivitäten (in Klammern sind die relativ zu entsprechenden Kontrollen resultierenden Aktivitäten angegeben):

Se-GPx (1,3%), NADPH-Cytochrom c Reduktase (35 %); Flavinhaltige Monooxygenase (50 %), Sulfotransferase (56 %).

Erhöhte Enzymaktivitäten:
EOC-O-Deethylase (340 %), Cytochrom-P 450-Hydroperoxidase (184 %), Hämoxygenase (220 %), UDP-Glucuronyltransferase (212 %), GSH-S-Transferasen (DCNB :310 %, CDNB : 250 %).

Alle diese Veränderungen sind reversibel: Eine halbmaximale Rückkehr zu den Ausgangswerten läßt sich mit einer Dosis von 7 µg Selen/kg erreichen,während es zur Induktion der Se-GPx einer halbmaximalen Dosis von 80 µg/kg bedarf. Die Autoren diskutieren dieses Ergebnis als mögliche Wirkung eines Se-GPx-unabhängigen, jedoch Se-abhängigen Modulators an zentraler Stelle im Translations- oder Transcriptionsprozeß.

Im Selenmangel sind u.a. viele weitere oxidative Stoffwechselwege betroffen, wie z.B. die phagozytotische Vernichtungskapazität der PMNL (52), möglicherweise wegen der rascheren Inaktivierung der NADPH-Oxidase durch eigene reaktive Produkte(53), die Modulation des Arachidonsäuremetabolismus in Blutplättchen (54) und Macrophagen (55). Ferner wird die Beteiligung der Se-GPx und der GSH-Transferasen (Tansferasen B (YaYa + YaYc) und AA (YcYc)) bei der Inhibierung der in vitro-LPO diskutiert, sofern die mikrosomale PLA2 aktiv ist (57).
Seit der Entdeckung des Selen-enthaltenden Proteins PIP (47), das auch Peroxide komplexer Lipide reduzieren kann (58), muß auf die Beteiligung peroxidierender Schädigungs- bzw. Schutzmechanismen beim Zustandekommen Selen - spezifischer Mangelsymptome zurückgekommen werden. Allgemei-

ne Fluiditätsänderungen scheinen solchen Vorgängen nicht zu grunde zu liegen: Es wurde in Mäuselebermikrosomen gezeigt, daß im Selenmangel der Sättigungsgrad mikrosomaler Lipide nicht zunimmt, sondern sich lediglich die Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren ändert (59).

1.3. Selenoproteine im Lebercytosol

Ein Ansatz zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung von Selen im Organismus höherer Tiere bedient sich der Methode der Radioisotopenmarkierung. Die vorliegenden Arbeiten zu diesem Thema sind jedoch kaum miteinander vergleichbar, da die einzelnen Versuchsdesigns sich in entscheidenden Punkten voneinander unterscheiden. Als ergebnisprägende Kriterien können hierbei folgende Punkte deduziert werden:

- Tierspezies,
- Selenstatus,
- applizierte Dosis,
- Markierungsdauer,
- Organspezifität,
- Analytische Methodik.

Einen Überblick über die bereits publizierten Untersuchungen zu Selenoproteinen der Säugetierleber, die mit dem Ansatz der radioaktiven Markierung durchgeführt wurden, bietet die folgende Zusammenstellung:

1	2	3	4	5	6
D.G. Brown & R.F. Burk 1973 (60)	Ratte	4 ppb 30 d "akuter Se-Mangel"	i.p. 75ng/kg ca. 130 g Tiere		Verteilung
R.F. Burk & P.E. Gregory 1982 (61)	Ratte	- - und + "chronischer Se-Mangel"	0,76 µg ca. 350-500 g Tiere	90,0 (n) 83,0 (n)	= Se-GPx = 75Se-P Gesamteinbau in das Cytosol geringer bei (Se-)-Ratten
M.A. Motsenbocker & A.L. Tappel 1982 (62)	Ratte	Standard-Diät	(Leber) Gewebe-schitte	45,0 (u) 80,0 (n)	in vitro Se - Einbau CHI-hemmbar
W.C. Hawkes et al. 1985 (63)	Ratte	20 ppb in der Diät und 20 ppb im Trinkwasser: 5 Monate	Sättigung mit 75Se 5 Monate	26.5 (u) 46,4 (u) 14,7 (u) > 89,0	= UE der GPx
J.T. Deagan &P.D. Whanger 1985 (64)	Ratte	- und +			Einbau in Se- > Se+; Gelfiltr: 75Se haupts. in GPx CHI-hemmbar bei Se+

Spalte 1:Literaturhinweis, 2:Tierspezies und Organ,3:Selenstatus(+=supplementiert,-=nicht definierter Mangel,-- =kontrollierter,strikter,chronischer Mangel),4:applizierte Dosis,Applikationsart und -ort,5:Molekulargewicht des Selenoproteins (n:nativ, u:Untereinheit (UE)), 6:Bemerkungen.

1.4. Zur Problematik des experimentellen Selenmangels im Tiermodell

Experimentelle Selenmangelstudien, in denen synthetische Diäten zum Einsatz kommen, sind nur unter Vorgabe von zwei Voraussetzungen aussagekräftig:

1. Selen sollte die einzige Variable im experimentellen System sein. D.h.,es müssen komplexe Mangelzustände, wie sie durch das gleichzeitige Fehlen von Selen, Vitamin E und Schwefelaminosäuren hervorgerufen werden können (65), durch eine adäquate Supplementierung der Diät mit Mineralien, Schwefelaminosäuren und Vitaminen ausgeschlossen werden.

2. Schließlich ist der Grad des Selenmangels u.U. ergebnis prägend: D.h., es ist zu unterscheiden zwischen akuten und chronischen Effekten. Erstere führen z.B. schnell zu einer Abnahme der Se-GPx, während letztere zu Verhältnissen, die nach längerandauerndem,strikterem Selenentzug drastische Auswirkungen auf vielfältige Stoffwechselleistungen haben (50). Zur Beurteilung gravierender Selenmangelzustände erscheint deshalb die ausschließliche Messung der Se-GPx nicht ausreichend.

2. PROBLEMSTELLUNG

Wie aus der Literaturübersicht zu entnehmen ist, können aus den vorliegenden Arbeiten, die mit dem Ansatz der Radioisotopenmarkierung versuchen, auf dem Wege der Isolierung Selen-einbauender Proteine Kenntnisse über die funktionelle Bedeutung und den Weg des Spurenelementes zu gewinnen, wegen ihrer methodischen Unterschiede und dem Grad des vorliegenden Selenmangels gar keine oder nur widersprüchliche Schlüsse gezogen werden. Zudem sind diese Untersuchungen ausschließlich an der Ratte durchgeführt worden.

Das Ziel dieser Studie ist es, am Nagetiermodell, und zwar an Mäusen, die langfristig genau definierte Selendiäten erhalten haben und deren Selenstatus anhand von Indikatorenzymen bestimmt wird, mit einer Tracerdosis des Spurenelementes, die zu einer halbmaximalen Restauration der Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme mit Ausnahme der Se-GPx führt, die Einbauraten in die Lebern und in Leberzellkompartimente defizienter und supplementierter Tiere zu untersuchen und mögliche Unterschiede bei der spezifischen Markierung cytosolischer Proteine nachzuweisen.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1. Chemikalien

Amersham Buchler (Braunschweig) : (75Se)-Natriumselenit, U(14C)-L-Leucin (spezifische Aktivitäten: vgl. 3.2.2.1)

Boehringer (Mannheim) : GSH, GSSG-Reduktase, NADH, NADPH, Isocitrat-DH, Phosphorylase b

Fluka (Buchs/Schweiz) : 1,2-Dichloro-4-nitrobenzol, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol

Peroxid Chemie (Höllriegelkreuth) : Cumolhydroperoxid, tert.-Butylhydroperoxid

Serva (Heidelberg) : N,N'-Methylenbisacrylamid, Acrylamid, Ammoniumpersulfat, Coomassie Brilliant Blue G250, 1,4-Dithioerythrit,EDTA Natriumdodecylsulfat, Cycloheximid

Sigma (München) : Phosphorylase b, TEMED, BSA , TRIZMA BASE

Merck, Darmstadt : Glycin (für medizinische Zwecke), Folin-Reagens, Trichloressigsäure, sowie alle anderen nicht aufgeführten Chemikalien mit p.a. Qualität.

Gereinigte Se-GPx aus Rindererythrocyten stellte freundlicherweise Prof. Dr. A. Wendel (Tübingen) zur Verfügung.

3.1.2. Geräte

Zentrifugen	: Servall Superspeed mit Rotor SS34 (Vetter, Wiesloch); Ultrazentrifuge L2-65B mit Rotor Ti50 (Beckman, München);
Photometer	: UV-300 'Double Beam-Dual Wavelength' und UV 210 'Split Beam' Spektralphotometer (Shimadzu, Düsseldorf); Eppendorf-Photometer (Netheler & Hinz, Hamburg);
Counter	: 1219 Rackbeta LSC, (LKB, Gräfelfing), ß-Counter LS 6800 (Beckman, München), Automatic Gamma Counter MR 480 TP (Kontron, München), Automatic TLC-Linear Analyzer LB 2842 mit Datensystem LB 500, (Berthold, Wildbad);
Elektrophorese-apparatur	: LKB 2001 mit Stromversorgung LKB 2002 (LKB, Gräfelfing);
FPLC-Apparatur	: Programmer 8-250 , Pumpen P-500, Zweikanalmonitor UV-2 mit Steuergerät und Fraktionssammler FRAC 100 (Pharmacia, Freiburg), Servogor-Zweikanalschreiber.

3.1.3. Spezielles Zubehör und spezielle Verbrauchsmaterialien

FPLC	:	HR 10 Leersäule und Polyanion Si 17 µm Anionenaustauscher (Pharmacia), 0,2 µm Einweg-Filter (Millipor), 0,2 µm Filter (Schleicher-Schüll);
Protein-Einengung	:	Zentrifugations-Konzentratoren (Amicon)
Radioaktivitäts-zählung	:	Atomlight-Scintillator (NEN, Dreieich).
Autoradiographie	:	Kodak X-O-MAT AR-Röntgenfilm (Kodak, Rochester, USA) und Verstärkerfolie 'Par Speed' (Du Pont de Nemours, Frankfurt)

3.1.4. Tiere und Tierfutter

Männliche NMRI han-Albinomäuse mit 20 g Körpergewicht wurden von der 'Lippischen Versuchstieranstalt' in Extertal bezogen.

Die Bestandteile der selbsthergestellten pulverförmigen Diät stellte freundlicherweise Prof. Dr. R.F. Burk (San Antonio / Texas) zur Verfügung.

Kommerzielle Selenmangel- und Kontroll-Diäten wurden von der Fa. Altromin (Lage) bezogen.

3.2. Methoden

3.2.1. Tierhaltung

Die Tiere wurden in Gruppen zu 4-6 Tieren in Macrolonkäfigen (Typ III) auf Stoffwechselböden bei einer Temperatur von 22-25 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und einem Tag- und Nacht-Rhythmus von 12 h gehalten. 8 Wochen erhielten die Tiere die kommerziellen selensupplementierten bzw. selendeficienten Diäten der Fa. Altromin, anschließend die auf Torulahefebasis selbsthergestellten pulverförmigen Selenmangel- und Kontrolldiäten folgender Zusammensetzung (66):

Torulahefe (30 %), Saccharose (57 %), Sojaöl (6,7 %), Vitaminmischung (1 %), Mineralienmischung (5 %), D,L-Methionin (0,3 %), D,L-α-Tocopherolacetat (100 IU/kg).

Aliquots der Diät dieser Zusammensetzung wurden mit 330 ppb Selen in Form von Natriumselenit versetzt und als Kontrolldiät ('selensupplementierte Diät') eingesetzt.

Die Tiere hatten ad libitum Zugang zum bidestillierten Trinkwasser und zum Futter.

3.2.2. Radioisotopenmarkierung

Die Markierung erfolgte, falls nicht anders vermerkt, nach folgendem allgemeinen Behandlungsschema:

Eingriff	Zeit (h)
Nahrungsentzug	-16
Bestimmung des Körpergewichts	- 2
(Bei Hemmstudien: Cycloheximid)	- 0.5
Natriumselenit	0
(Erhaltungsdosis: Cycloheximid)	(+3)
(Bei Doppelmarkierungsstudien: L-Leucin)	(+5.75)
Dislokation der HWS, Leberentnahme	+ 6

Alle Substanzen wurden i.p. appliziert. Die Volumenkontrolle erfolgte durch möglichst genaues Verabreichen und das Abwiegen der Spritze vor und nach der Injektion. Der Zeitpunkt 0 des Behandlungsschemas entsprach in allen Fällen 10.00 Uhr. Bei Markierungen über 24 und 48 h mit erhielten die Tiere in der Nacht des ersten Behandlungstages noch einmal Futter. Sie hatten in allen Fällen uneingeschränkten Zugang zum bidest-Trinkwasser. Bei Hemmstudien wurden jeweils 83 mg Cycloheximid / kg in 400 µl physiologischer Kochsalzlösung injiziert.

3.2.2.1. Proteinmarkierung mittels (75Se)-Natriumselenit

Das Ziel der ersten Markierungsexperimente war es, abzuklären, ob bei der gegebenen Dosis von 10 µg Se/kg Körpergewicht die Markierungdauer einen Einfluß auf die spezifische Markierung cytosolischer Proteine hat. Deshalb wurde Mäusen, die 30 Tage die pulverförmige Diät erhalten hatten, gemäß dem Behandlungsschema (vgl. 3.2.2.) Natriumselenit in einer Dosis von 10 µg Se/kg verabreicht, jeweils 2 Tiere nach 3, 6, 24 und 48 h getötet, die Lebern entnommen und aufgearbeitet.

Zur Quantifizierung der Einbaurate von 75Se in die Leber und in Zellkompartimente in Abhängigkeit von der Dauer der Versorgung mit Diäten verschiedenen Selengehaltes wurden gleichaltrige (Se)- und (Se+)-Tiere 6 Stunden nach i.p. Applikation der Tracerdosis getötet.

Radioaktiv-markiertes Natriumselenit wurde von Amersham-Buchler in 2 Chargen bezogen:

Charge I) : 20 mCi/mg Se und 0,046 mg Se/ml Lösung;
Charge II) : 8 mCi/mg Se und 0,130 mg Se/ml Lösung.

Die Chargen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung jeweils so verdünnt, daß in Abhängigkeit vom Körpergewicht ein Volumen von 380 ± 40 µl appliziert werden konnte.

Zur Proteinmarkierung in vitro wurden je 2 ml verschiedener kalter Mäuseleber 105 000 g Überstände (ca.10 mg Protein/ml) mit 10 ng 75Se (100 000 cpm) versetzt und im Schüttelbad 30 Minuten bei 37 ° C inkubiert.

3.2.2.2. Proteinmarkierung mittels L-(U-14C)-Leucin

L-(U-14C)-Leucin in 2 % -iger Ethanol-Lösung (348 mCi/mMol) von Amersham-Buchler wurde mit physiologischer Kochsalzlösung 1:4 verdünnt und den Mäusen, die 100 Tage mit der Pulverdiät ernährt worden waren, genau 15 Minuten vor der Tötung in einem Volumen von 400 µl (5 µCi) i.p. injiziert. Diese Studie diente zur Aufklärung der Frage, ob Unterschiede bei der Proteinbiosynthese bestehen.

3.2.2.3 Doppelmarkierung mit (75Se)-Senenit und L-(U-14C)-Leucin

Mit dem Ziel festzustellen, ob mit dem Seleneinbau in die Leberproteine eine allgemein erhöhte Proteinsynthese einhergeht, wurde Mäusen, die nach Behandlungschema (vgl. 3. 2. 2.) markiertes Selenit erhalten hatten, 15 Minuten vor Tötung und Leberentnahme 14C-Leucin verabreicht.

3.2.2.4. Messung der Radioaktivität und Bewertung

Die gamma-Aktivität wurde mit dem Automatic Gamma Counter MR 480 TP bestimmt. Da die Zählgeometrie die Meßergebnisse beeinflußt, wurden für Proben, die miteinander verglichen werden, immer die gleichen Volumina für die Zählung eingesetzt.

Wegen der im Vergleich zum Dauer der Studie relativ kurzen Halbwertszeit von 75Se-Selen (120 d), wurde am jeweiligen Versuchstag die aktuelle Aktivität der Selenit-Lösung bestimmt. Am Ende wurden alle Messungen,die zueinander quantitativ in Relation gesetzt werden,auf die spezifische Aktivität von 8 mCi/mg Se normiert, um einen Vergleich zu ermöglichen.

Die beta-Aktivität wurde mit dem ß-Counter LS 6800 von Beckmann gemessen. Anhand einer Quenchkurve und der automatischen Bestimmung der Quenchzahl H wurde sichergestellt, daß untereinander in Relation gesetze Meßergebnisse vom Probenquench nicht größer als 2 % der Gesamtausbeute beeinflußt werden.

Die Aktivität der doppelmarkierten Cytosole kann durch Zählung der jeweiligen ß-Aktivitäten von 14C und 75Se mit verschieden gesetzten Fenstern nicht zuverlässig bestimmt werden. Wenn 75Se in den Proben vorliegt, ist die ß-14C-Radiodioaktivität nicht zu Quantifizieren, da die ß-Spektren von 14C und 75Se sich in Abhängigkeit vom Probenquench überlappen (vgl. 4.6.). Deshalb erfolgte die Bestimmung der um den Selenanteil bereinigten 14C-ß-Aktivität nach der Formel:

14C-ß-Aktivität	=	ß-Gesamtaktivität	- 2 x	Gamma-Aktivität
(cpm)		(cpm)		(cpm)

Der Korrekturfaktor geht auf die Bestimmung der Aktivität von 75Se-Standardlösungen in einem den Proben vergleichbaren Volumen und unter gleichen Quenchverhältnissen zurück. Es ist gesichert, daß im Selenkanal des Kontron-Gamma-Counters unter Versuchsbedingungen die ß-Aktivität nicht erfaßt wird.

3.2.3. Aufarbeitung der biologischen Proben

Die nach Schema (vgl. 4.1) behandelten und gewogenen Tiere wurden durch Dislokation der HWS getötet, die Lebern in situ mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung perfundiert und nach Entfernung der Gallenblase entnommen. Nach Bestimmung des Lebergewichts und Einstellen des Gewichts auf genau 9,0g mit Isolierungspuffer (0.1 Mol/Liter Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 ,unter Zusatz von 1 mMol/Liter GSH, 0,1 mMol/Liter EDTA und 1 mg/ml fettsäurefreiem BSA) wurden die Lebern mit der Schere zerkleinert und im 15 ml Potter-Elvehyem-Glashomogenisator in 3 Durchgängen a 20 sec homogenisiert. Nach Entnahme von Aliquots für Protein- und Aktivitäts-Bestimmungen wurde das Homogenat durch differentielle Zentrifugation fraktioniert (67).In allen Schritten wurde durch Abwiegen sichergestellt, daß vergleichbare Fraktionen weiterverarbeitet wurden. Um die Strahlenbelastung gering zu halten, wurde auf eine Wäsche des 100 005 g Niederschlags verzichtet. Der Gehalt an Cytochrom P450 und Cytochrom b5 dienen für diese Fraktionen als Markerenzyme, während aus dem Überstand die LDH-Aktivität bestimmt wurde. Aliquots dieser Fraktionen wurden für Protein- und Aktivitätsbestimmungen eingesetzt. Während die Cytochrom P 450 und b5 -gehalte sofort im Anschluß an die Fraktionierung bestimmt wurden, sind die 105 000 g Überstande zunächst bei -20 °C gelagert worden. Die Enzymaktivitäten der gefrorenen Proben wurden spätestens 48 h nach dem Einfrieren zum ersten Mal bestimmt, während bei FPLC - Trennungen die analytischen Läufe innerhalb einer Woche abgeschossen wurden. Aliquots der gefrorenen und bei -20 ° C gelagerten Proben wurden auch nach über einem Jahr rechromatographiert und ergaben vergleichbare Radioaktivitätsprofile.

3.2.4. Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie (Ionenaustausch und Gelfiltration) wurde mit dem FPLC-System von Pharmacia durchgeführt. Alle Elutionsmittel und Proben wurden vor den Läufen mittels Filtration durch 0,2 µm-Filter von Partikeln befreit. Die Detektion der Proteine erfolgte anhand des Elutionsprofils bei 280 nm.

3.2.4.1. Ionenaustausch-Chromatographie

Die Trennung der 105 000 g Überstände (15 ± 5 mg Protein/ml) erfolgte mittels Ionenaustausch-Chromatographie in einer mit dem schwachen Anionenaustauscher Polyanion Si 17 selbstgestopften HR 10 FPLC -Säule (Säulenvolumen 10 ml). Dabei wurde nach Injektion von 500 µl bzw. 1 ml (analytische Läufe) bis 5 ml Probe 12 Minuten mit dem Ausgangspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,2) nachgewaschen und mit dem ersten Gradienten (0 - 500 mMol/Liter NaCl, 40 min) eluiert. Ein zweiter steilerer Gradient (0,5-1,0 mM, 5 min) schloß sich hieran an. Zum Abschluß wurde mit zunächst 10 min mit 1 M , dann mit 2 M NaCl gespült. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 4 ml/min und die Fraktionsgröße 2,8, 3,2 oder 4 ml pro Fraktion.

3.2.4.2. Gelfiltrations-Chromatographie

Zur Bestimmung der Molekulargewichte nativer Proteine wurde die Superose 12 prepacked HR 10/30 Säule von Pharmacia eingesetzt. Die Proben wurden in einem Volumen von 100 µl einge-

spritzt und isokratisch mit 50 mMol/Liter Natriumphosphatpuffer , pH 7,2 und einer Laufgeschwindigkeit von 0,3 ml/min eluiert. Als Markerproteine dienten (die Molekulargewichte in kDa):
Aldolase (147), Rinderserumalbumin (68), Ovalbumin (45) und Chymotrypsinogen (25).

3.2.5. Elektrophorese

Die diskontinuierliche SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (68) wurde für die Trennung der Proteine nach ihren Molekulargewichten eingesetzt.Die Trenngele enthielten einen Polyacrylamidgradienten von 6 bis 24 %, die Sammelgele waren duchgehend 4 %-ig. Das Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid betrug immer 100 : 2,68.Alle Elektrophoresen wurden mit Gelen der Größe (140 x 120 x 1,5 mm) bei konstanter Stromstärke (37 mA/Gel) durchgeführt.
Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 100 mM DTE 2 Minuten bei 100° C reduziert. Zur Kontolle der vollständigen Reduktion wurden paralellen Ansätzen ß- Mercaptoethanol zugegeben (5 %).
Als Markerproteine dienten:
Phosphorylase b (92 kDa), BSA (68 kDa), OA (45 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), Trypsin-Inhibitor (21,5 kDa),Myoglobin (17,8 kDa) und Lysozym (14,5 kDa).
Fixierung und Färbung erfogte nach Fairbanks (69). Zur Ermittlung der Radioaktivität wurden die Gele entweder noch im feuchten Zustand in 1,5mm dicke Streifen geschnitten und diese im Gamma-Counter gezählt, oder die unter Vakuum und bei 70 °C getrockneten Gele mit dem Linear-Analyser gescannt.
Die Fotographie und die Autoradiographie der gefärbten und getrockneten Gele dienten zur Dokumentation.

3.2.6. Biochemische Analytik

Test	Absorptionskoeffizient und Wellenlänge $mM^{-1}\ cm^{-1}$	nm	Temperatur °C	Lit.
Cytochromgehalt:				
Cytochrom-P450	91	(E 450-490)	RT	70
Cytochrom-b5	185	(E 426-409)	RT	71
EOC-O-Deethylase (fluorimetrisch)	Excitation: 366 Emission : 460		RT	72
GPx *) (Gekoppelter Test)	3,5	(E 366)	37	73,74
GSH-S-Transferasen				
CDNB	9,6	(E 340)	RT	75
DCNB	8,5	(E 345)	RT	75
LDH	6,1	(E 334)	25	76
Proteinbestimmung **):				
Lowry		(E 578)	RT	77
Biuret ***)		(E 536)	37/20 min	78

*) Die Wasserstoffperoxid-Konzentration wurde auf 88 µM

im Test erniedrigt, um bei einer geringeren Spontanreaktion die kleinen Aktivitäten in selendefizienten Proben zuverlässig zu erfassen. Es wurde sichergestellt, daß mittels geeigneter Probengröße bei allen vorliegenden Proben gleiche Aktivitäten gemessen werden wie mit der in der Literatur angegebenen größeren Substratkonzentration.

**) Die Konzentrationsangaben wurden auf eine Verdünnungsreihe von 98%-igem BSA bezogen.

***) Stark proteinhaltige und trübe Proben wurden mit KCN entfärbt, nach 1 stündigem Stehen bei RT erneut gemessen und die Werte um den Anteil der Trübung korrigiert. Entsprechend wurde mit der BSA-Eichgerade verfahren.

3.2.7. Statistische Bewertung der Ergebnisse

Quantifizierte Beobachtungen werden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwerte mit Standardabweichungen und Größe des Tierkollektivs (n) angegeben. Sofern Selenmangel- und selensupplementierte Tiere miteinander verglichen werden, handelte es sich in allen Fällen um gleichaltrige Mäuse, die sich einzig im Selengehalt ihrer Diäten unterschieden. Angeführte Signifikanzen sind nach dem t-Test nach Student bestimmt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Tiere und Selenstatus

4.1.1. Körpergewicht und Lebermasse

Da in Einzelversuchen gezeigt werden konnte, daß auch geringfügige Unterschiede in der Belegungsdichte der Käfige drastische Auswirkungen auf das Freßverhalten der Tiere und somit auf die Körpergewichte der Tiere haben können (vgl. auch 79), wurden Tiere aus mit gleicher Anzahl besetzten Käfigen untereinander verglichen. Die Tab. 1 und die Abb. 1 bieten einen Überblick über die Körpergewichte, Lebermassen und die Relation Leber- zum Körpergewicht in Abhängigkeit von der Dauer der Diätierung mit der pulverförmigen Diät. Zusammengestellt sind die von unbehandelten und mit physiologischer Kochsalzlösung bzw. Natriumselenit-Lösung behandelten Tieren gewonnenen Werte, wobei sichergestellt ist, daß diese Behandlung unter Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf die erhobenen Parameter hat.

Die Körpergewichte sind bei 16 h nüchternen Mäusen gewonnen.

Tabelle 1:

Körper- und Lebergewichte in Abhägigkeit von der Dauer der Diätierung

Tage	Diät (± Se)	Körpergewicht (g)	Lebergewicht (g)	Leber-Körpergewichts-Relation (%)	(n)
60	-	38,76 ± 0,81	1,55 ± 0,20	4,00 ± 0,53	7
	+	40,72 ± 2,07	1,70 ± 0,16	4,28 ± 0.39	7
66	-	38,90 ± 0.94	1,53 ± 0.16	3,92 ± 0,36	4
	+	38,95 ± 0,39	1,62 ± 0,07	4,18 ± 0,19	4
90	-	37,30 ± 2,71	1,51 ± 0,19	4,07 ± 0,22	5
	+	41,25 ± 2,46	1,68 ± 0,09	3,89 ± 0,27	5
100	-	38,88 ± 1,19	1,64 ± 0,16	4,20 ± 0,31	7
	+	39,89 ± 2,47	1,58 ± 0,11	3,87 ± 0,35	5
120	-	38,96 ± 2,87	1,72 ± 0,13	4,44 ± 0,45	5
	+	39,39 ± 3,67	1,54 ± 0,14	3,91 ± 0,30	5

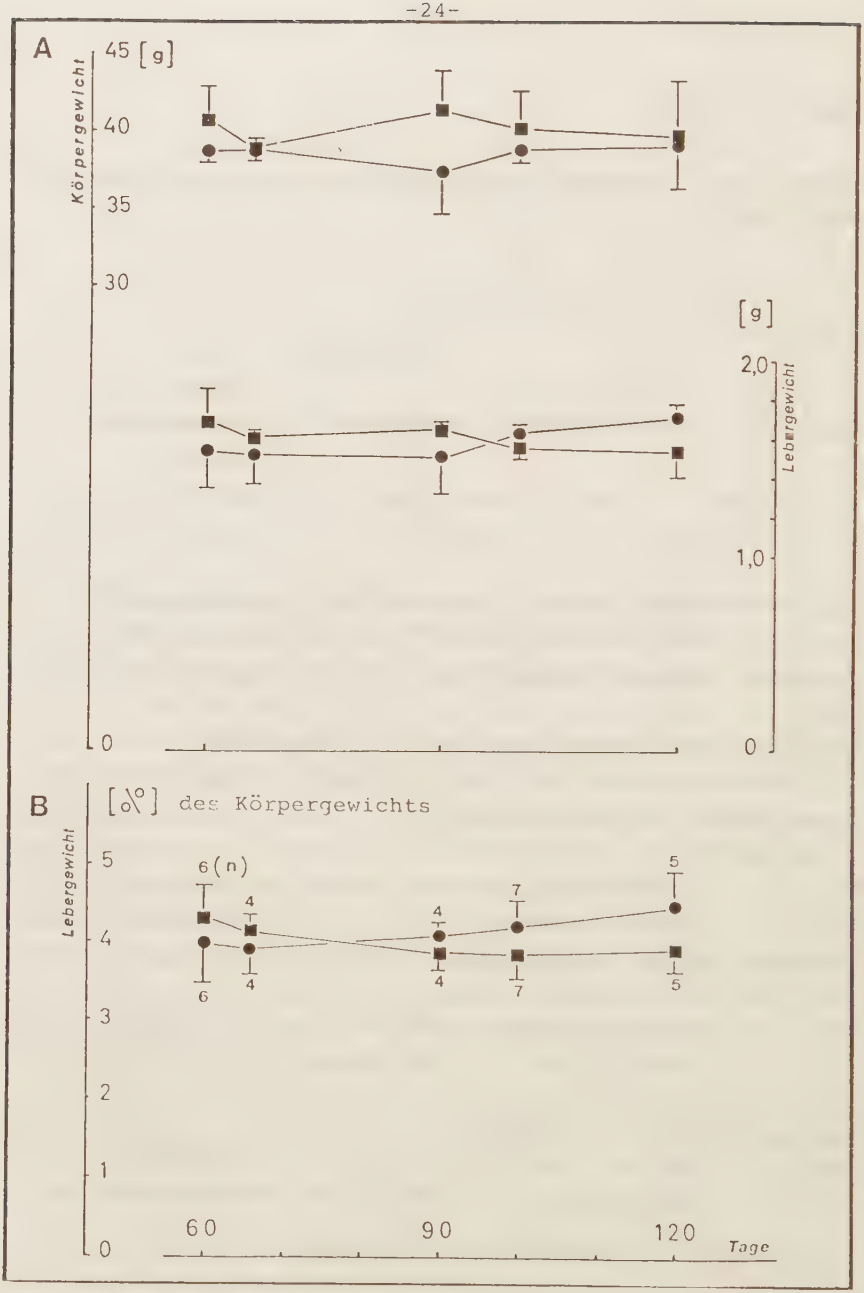


Abb. 1: Körper- und Lebergewichte in Abhängigkeit von der Dauer der Diätierung (A) und Lebergewichte als % des Körpergewichts (B) selensupplementierter (■), selendefizienter (●) Mäuse.

4.1.2. Selenstatus

Die gemessenen Enzymaktivitäten der mit einem Körpergewicht von 20 g bezogenen und 60 Tage mit den kommerziellen pelletierten Diäten ernährten Mäuse sind Anzeichen für das Vorliegen eines "akuten" Selenmangelzustandes:

Tabelle 2: Indikatorenzymaktivitäten "akut"-selendeficienter Mäuse und supplementierter Kontrollen.

Enzym	Substrat	n	Spezifische Aktivität (mU/mg) Se+	Se-	Relative Veränderung (%)
Se-GPX				*)	
Leber	H2O2	6	589±68	26±8	4,4
				*)	
Erythrocyten	H2O2	3	56±17	4±0,9	6,9
S-Tansferasen	CDNB	6	2071±457	2750±350	133

Signifikanz: *) P ≥ 0,001.

Beim Verbleiben bei der Fütterung mit den Altromin - Diäten - die Selenmangeldiät enthielt 27 ppb Selen- sind auch nach 7 Monaten keine weitergehenden Modulationen zu beobachten: Die Leber-Se-Gpx weist bei Mangeltieren eine spezifische Aktivität von 26 ± 5 mU/mg (n=3) mit Wasserstoffperoxid auf (5,3 % der Kontrollaktivität), die S-Transferase mit CDNB 2013 ± 226 mU/mg (122 %) (vgl. auch 79).

Die 60 d mit der obigen Diät ernährten Mäuse wurden auf die pulverförmige Kontroll- bzw. Selenmangeldiät, die ≤ 10 ppb Selen enthält, umgesetzt und dieser Tag als Punkt 0 der Fütterungsstudie definiert.
Nach 30 d wiesen diese Tiere bereits Merkmale eines weitaus drastischeren Selenmangels auf:

Tabelle 3: Indikatorenzymaktivitäten "chronisch"-selendefizienter Mäuse in Abhängigkeit von der Dauer der Diätierung im Vergleich zu Kontrollen.

Enzym	Spezifische Aktivität (mU/mg)				Relative Aktivität von bei
	Se+	n	Se-	n	Se- (%)
30-40 d:					
Se-GPx	593±68	6	7,2±1,8*)	6	1,2
GST (CDNB)	1621	2	2835	2	175
EOC	0,7±0,1	4	1,6±0,2*)	3	229
60-70 d:					
Se-Gpx	651±105	8	5,2±1,2*)	8	0,8
90 -100 d:					
Se-GPx	638±105	6	5,4±3,6*)	8	0,84
GST (CDNB)	2106±113	3	5758±625*)	3	267
120 d:					
Se-GPx	685±98	5	5,3±0,8*)	5	0,78
GST (CDNB)	1174±225	5	3336±897*)	5	284

Signifikanz: *) P ≥ 0,001.

Während ab dem 60. Tag mögliche relative Veränderungen der Se-GPx-Aktivität nur schwer festzustellen sind, ist mit der Dauer der Studie eine kontinuierliche relative Zunahme der S-Transferasen-Aktivität mit CDNB als Substrat zu beobachten.

Bei dem Gehalt des 105 000 g Niederschlages an Cytochrom b5 und P450 sind zwischen dem 40 und dem 120 Tag keine signifikanten Veränderungen vorhanden:

Tabelle 4: Gehalt an Cytochrom b5 und P450 (nMol/mg Protein)

	Diät	n	40 d	n	120 d
Cytochrome					
b5	Se+	4	0,28±0,05	5	0,36±0,05
	Se-	3	0,39±0,04	5	0,34±0,04
P450	Se+	4	0,63±0,15	5	0,71±0,12
	Se-	3	0,77±0,03	5	0,64±0,08

Ebenfalls nicht signifikant unterscheidbar ist der Proteingehalt auch nach 120 d: Während die Lebern der Kontollmäuse (n=5) 138 ± 7 mg Protein/g Leberfeuchtmasse enthalten, erhöht sich der Proteingehalt bei Mangeltieren bei der eingesetzten kleinen Tierzahl nicht-signifikant ($P \geq 0,1$) leicht auf 146 ± 5 (n=5).

4.2. Fraktionierte Zentrifugation

Die Aktivität der LDH und der Gehalt an Cytochrom b5 und Cytochrom P450 dienten als Marker für die durch Ultrazentrifugation gewonnenen 105 000 g überstände bzw. Niederschläge. Während von Cytochrom P450 und b5 der Mäuseleber berichtet ist, daß der Gehalt dieser Proteine vom Selenstatus nicht beeinflußt wird (50), ist die LDH-Aktivität nicht untersucht.

Tabelle 5:
Markerproteine für die Ultazentrifugationsfraktionen

Protein	Se+	n	Se-	n
Mikrosomale Marker:				
Gehalt (nMol/mg)				
Cytochrom b5	0,36±0,09	9	0,38±0,04	8
Cytochrom P450	0,76±0,17	9	0,76±0,09	8
Cytosol-Marker				
LDH				
Volumenaktivität (mU/ml)	16230±4890	5	15770±4380	5
Spezifische Aktivität (mU/mg)	1850±350	5	1330±380 *)	5

Signifikanz: *) P ≥ 0,001.

4.3. Quantifizierung der 75Se-Gamma-Aktivität in der Mäuseleber

Durch Abwiegen der Spritze mit Injektionslösung an der Analysenwaage vor und der leeren Spritze nach der Applikation wurde sichergestellt, daß die bei diesem Schritt gemachten Fehler kleiner als 2 % waren. Die Zählausbeute des Gamma-Counters im Selenkanal beträgt für die eingesetzten Volumina 39 % . Die Aufarbeitung der Lebern für die Quantifizierung 6 h nach Injektion der Natriumselenit ist durch Vorversuche begründet (vgl. 4.4.1.).

4.3.1. 75Se-Aktivität in den Leberhomogenaten

Nach Verabreichung von 10 µg Selen/kg als (75Se)-Natriumselenit lassen sich unabhängig vom Selenstatus nach 3 bis 24 h ca. 10,5 % und nach 48 h 7 % der applizierten Aktivität in der Leber nachweisen. Differenziert bietet sich folgendes Bild (Angaben in % der applizierten Dosis):

Diät	h	3	(n)	6	(n)	24	(n)	48	(n)
(Se+)		-		10,0±1,3	15	-		7,1	2
(Se-)		10,5	2	11,5±2,6	16	9,7	2	7,3	2

Dabei befinden sich bei 60 bis 120 d diätierten Mangeltieren nach einer Markierungsdauer von 6 h 4±1,5% der Dosis im 105 000 g Überstand (n=14), 0,7 ± 0,2 % im 105 000 g (n=14) und 4 ± 1,3 % im 10 000 g Niederschlag (n=5). Die entsprechenden Werte für Se-supplementierte Mäuse lauten 3,4 ± 1,3 (n=14), 0,6 ± 0,3 (n=14) und 3,4 ± 0,8 % (n=5). Die Wiederfindung beträgt 75,6 bzw. 74 %.

In den Gesamtleberhomogenaten Selen-defizienter Mäuse, die länger als 60 Tage mit der pulverförmigen Diät ernährt worden sind, läßt sich nach einer Markierungsdauer von 6 h signifikant mehr Aktivität nachweisen als in Lebern gleichaltriger selensupplementierter Kontrolltiere.
Ein gleichsinniges Bild ergibt sich,wenn die Aktivität auf das Leberfeuchtgewicht bezogen wird (cpm x 1000):

Tierkollektiv	n	absolut	pro g Leber
Se -	18	316 ± 50*)	196 ± 29*)
Se +	18	271 ± 42	171 ± 25

Signifikanz: *) P ≥ 0,01.
Die zeitliche Auflösung nach der Dauer der Diätierung zeigt,daß erst nach 60 d signifikante Unterschiede zu beobachten sind (vgl. Abb.2).

Tabelle 6: 75Se- Aktivität in Leberhomogenaten

	60 d	n	90-100 d	n	120 d	n
absolut (cpm x 1000):						
Se-	284 ±27	6	343 ±33**)	7	317 ±67*)	5
Se+	289 ±49	6	279 ±30	7	239 ±27	5
pro g Leber (cpm x 1000):						
Se-	194 ±31	6	208 ±21**)	7	184 ±32*)	5
Se+	181 ±28	7	173 ±23	7	156 ±14	5

Signifikanz: *) P ≥ 0,01; **) P ≥ 0,001.

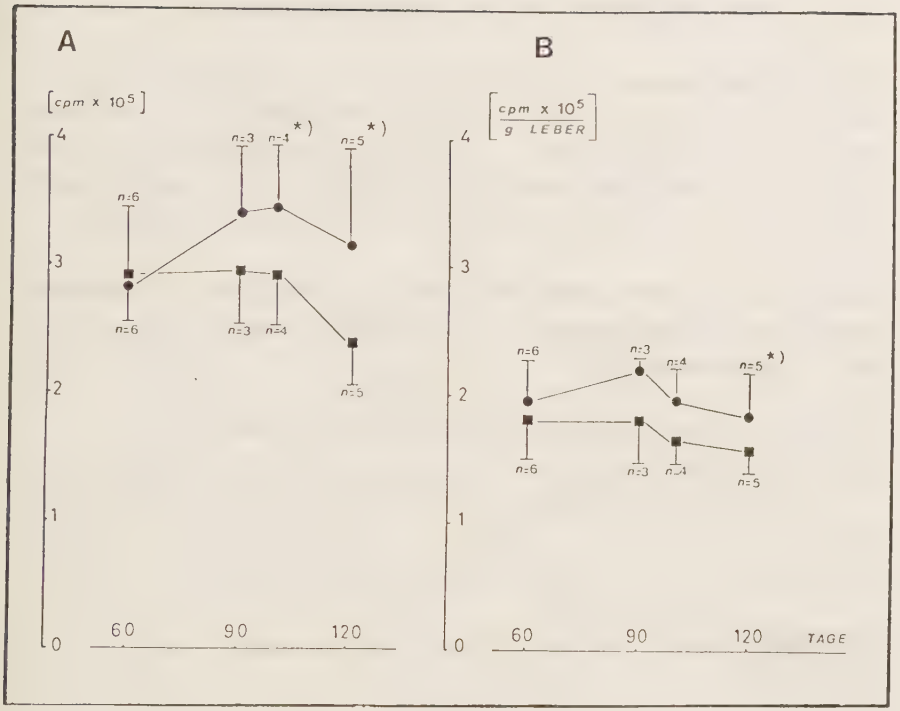


Abb. 2: 75Se- Aktivität in den Lebern selensupplementierter (•) und selendeficienter (·) Mäuse 6 h nach i.p. Applikation von (75Se)-Natriumselenit (10 µg Se/kg) (A) und Aktivität pro g Leberfeuchtmasse (B) in Abhängigkeit von der Dauer der Diätierug. Signifikanz : *) P ≥ 0,01.

Eine zweimalige i.p. Applikation von Cycloheximid (83 mg/kg) entsprechend dem allgemeinen Behandlungsschema setzt unabhängig vom Selenstatus die in der Leber auffindbare Gamma-Aktivität bei einer Markierungsdauer von 6 h um ein Drittel herab. Diese Hemmstudie wurde mit Mäusen, die 60 d mit der pulverförmigen Diät ernährt worden waren, durchgeführt.

4.3.2. 75Se-Aktivität in zellulären Fraktionen

Ein den Homogenaten vergleichbares Bild ergibt sich auch für die 105 000 g Niederschläge und Überstände: 717 ± 140 bzw. 899 ± 121 cpm/mg Protein in den Mikrosomen supplementierter (n=14) bzw. nicht supplementierter (n=14) Tiere und 1055 ±149 (n=18) bzw. 1154 ± 190 (n=18) in den Überständen (cpm/mg).

Die in den 105 000g Niederschlägen und Überständen gemessenen Gamma-Aktivitäten bezogen auf das Protein sind in Tab. 7 und Abb. 3 zusammengefaßt:

Tab 7: 75-Se-Aktivität in 105 000 g Fraktionen

Tage	60 d		90-100 d		120 d	
Diät		(n)		(n)		(n)
ÜBERSTÄNDE (cpm/mg):						
Se -	1047 ± 75	(6)	1276 ± 149	(7)	1110 ± 235	(5)
Se +	1020 ± 81	(6)	1095 ± 185	(7)	1039 ± 144	(5)
NIEDERSCHLÄGE (cpm/mg):						
		*)		**)		*)
Se -	892 ± 28	(6)	757 ± 21	(3)	993 ± 138	(5)
Se +	737 ±122	(6)	550 ± 68	(3)	792 ± 107	(5)

Alle Angaben in cpm pro mg Protein.
Signifikanzen: *) P ≥ 0,05; **) P ≥ 0,01.

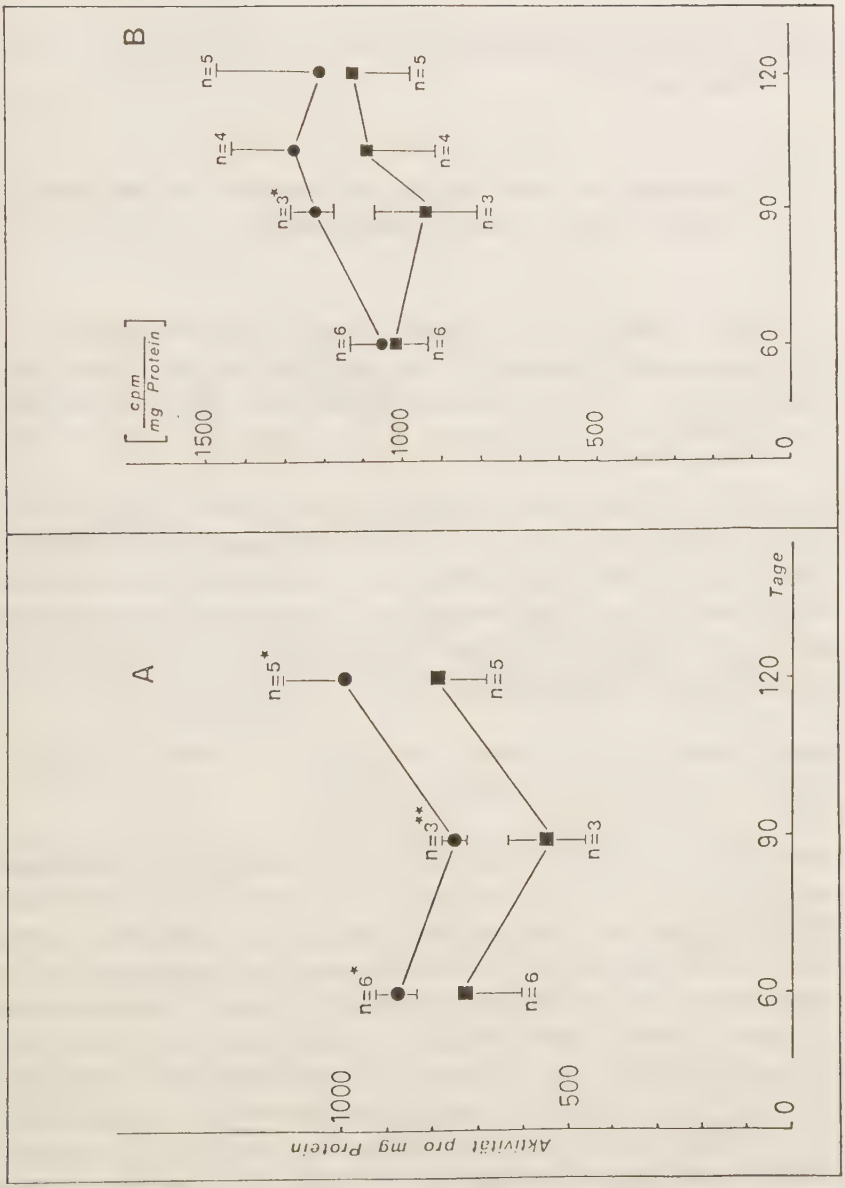


Abb. 3: 75Se-Aktivität (cpm/mg Protein) in 105 000 g Niederschlägen (A) und Überständen (B) supplementierter (■) und deficienter (●) Mäuselebern 6 h nach i.p. Applikation von 10 µg Se/kg als Natriumselenit in Abhängigkeit von der Dauer der Diätierung.
Signifikanzen: *) P ≥ 0,05; **) P ≥ 0,01.

4.4. Radioaktivitätseinbau in Proteine des 105 000 g Überstandes

4.4.1. Nachweis von 75Se-markierten Proteinen in der löslichen Fraktion mittels SDS-PAGE

Die in der filtrierten löslichen Fraktion der Mäuseleberzellen nachweisbare 75Se-Aktivität läßt sich mit 80 %-igem EtOH bzw. mit 25 %-igem TCA bei einer Wiederfindungsrate von 83±7 % bzw. 82±4 % fast vollständig fällen (94±4 bzw. 90±3 %,n=6).

Unter reduzierenden Bedingungen sind aus dieser Fraktion markierter (Se-)-Mäuselebern nach discontinuierlicher SDS-PAGE 5 markierte Proteine bzw. Proteinuntereinheiten nachzuweisen. Anhand der Eichproteine ergeben sich nach 5 unabhängigen Läufen aus 5 verschiedenen Lebern ohne Ansehen des Selenstatus folgende Molekulargewichte:

54000 ± 4000 (1); 23000 ± 300 (3); 13000 ± 3000 (5)
48000 ± 4000 (2); 20000 ± 700 (4);

Während sich aus den Autoradiographien der Elektrophoresen von Mangeltierlebern, die nach 3, 6 oder 24 Stunden nach Verabreichung der radioaktiven Markierung getötet worden sind, keine Hinweise auf Verschiebungen des Bandenmusters in Abhängigkeit von der Markierungsdauer ergeben, bestehen gravierende Unterschiede zwischen Selen-supplementierten und Selenmangeltieren. Im 105 000g Überstand der (Se+)-Mäuse dominiert Protein Nr.3 mit dem Molekulargewicht 23 kDa, während Nr.4 gar nicht und die übrigen wesentlich schwächer markiert sind als beim (Se-)-Tier. Bei Mangelmäusen ist das Protein Nr.4 die Hauptfraktion (vgl. Abb. 4):

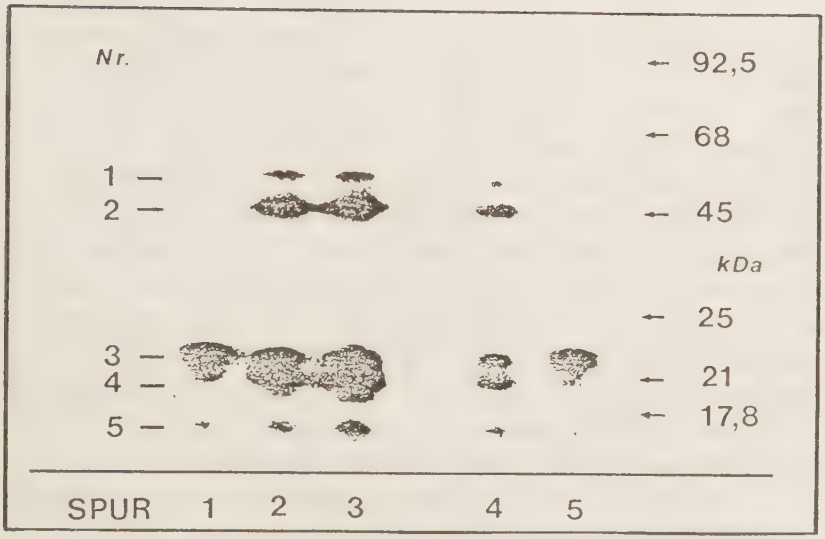


Abb. 4:
Autoradiographie in vivo markierter, DTE-reduzierter und elektrophoretisch getrennter 105 000g Überstände supplementierter (Spuren 1 und 5) und Se-deficienter (Spuren 2, 3 und 4) Mäuselebern.

4.4.2. Säulenchromatographische Trennung der 100 005 g Überstände

4.4.2.1. Ionenaustausch-Chromatographie in vivo markierter Überstände

Mit FPLC an dem Anionenaustauscher Polyanion Si 17 wurde ein schnelles Trennsystem (60 Minuten) entwickelt, das filtriertes Cytosol effektiv und reproduzierbar in analytischem Maßstab zu trennen vermag. Abb. 6 demonstriert eine repräsentative Trennung im Hinblick auf die Aktivitäten der GPx mit CuOOH und Wasserstoffperoxid und der GST mit CDNB. Aufgetragen wurden 1 ml filtriertes Lebercytosol einer mit Normal - Diät von Altromin ernährten Maus (20 mg Protein).

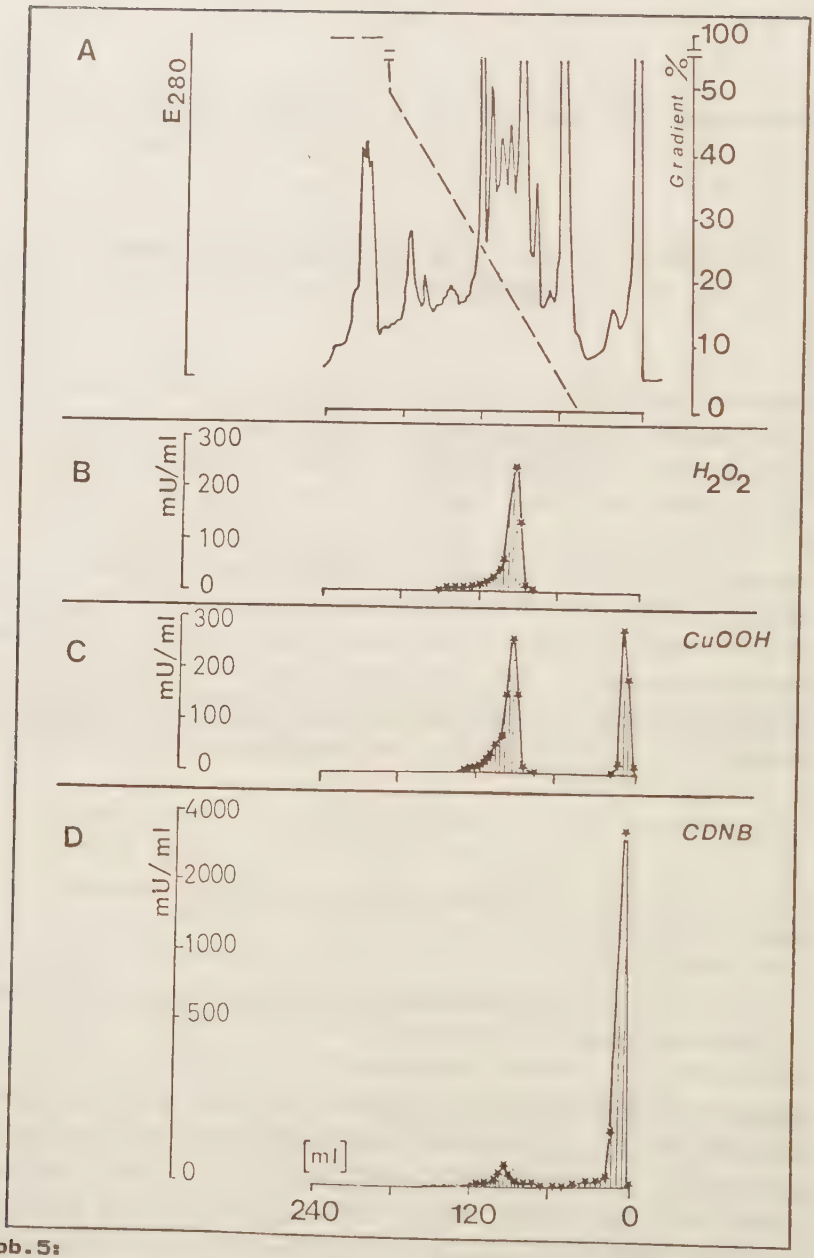
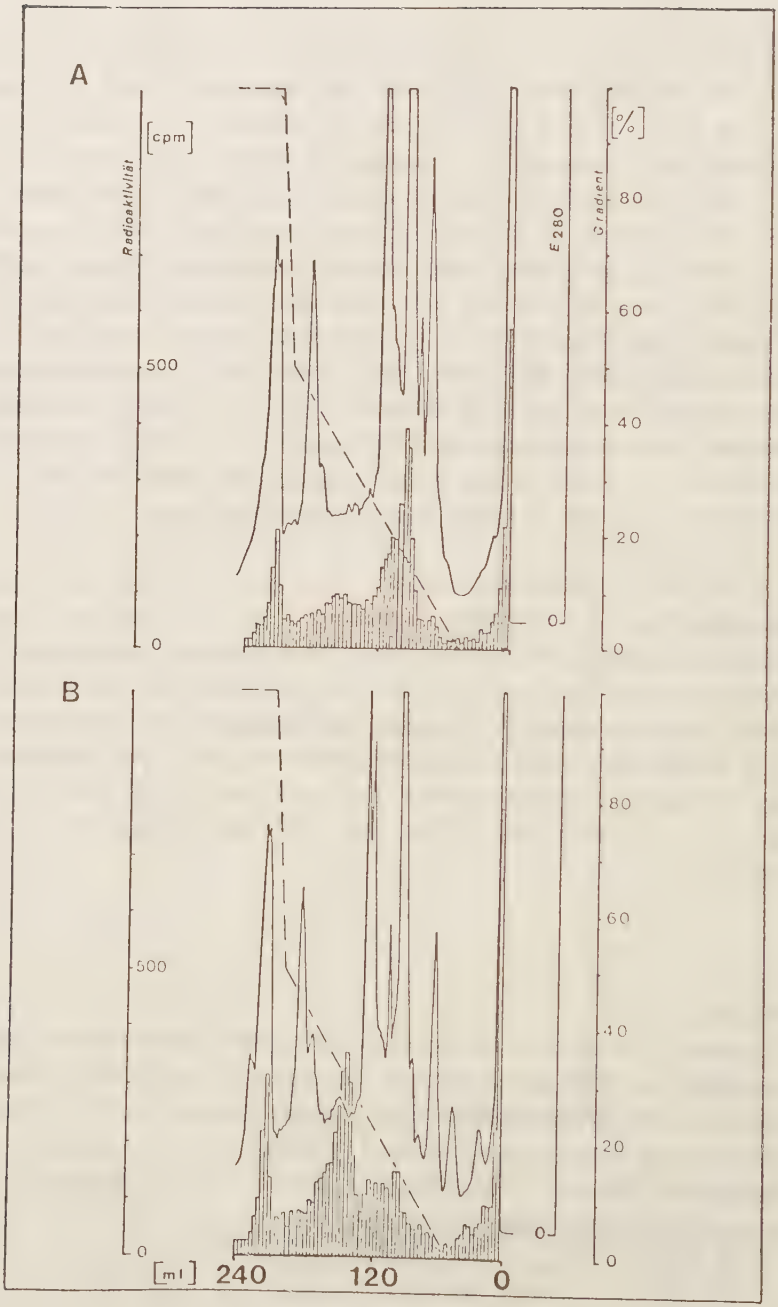


Abb.5:
FPLC-Trennung von 1 ml 105 000 g Leber-Überstand an Polyanion Si17 (A), Volumenaktivitäten (⋆-⋆-⋆) von Se-GPx mit H2O2 (B), von GPx mit CuOOH (C) und von GST mit CDNB (D). Gradient (— — —), Extinktion bei 280 nm (———). Elution mit 20 mM Tris/HCl, Elutionsgeschwindigkeit : 4 ml/min, Fraktionen a 4 ml, Salzgradienten von 0–0,5 M und 0,5–1,0 M NaCl.

Die Wiederfindung für die in den ersten 2 Fraktionen in einem Volumen von 8 ml eluierten GST-Hauptaktivität mit CDNB betrug 68 % (78 % für die GST-Aktivität mit DCNB). Eine saurere mit CDNB aktive Komponente wurde in den Fraktionen mit Se-GPx-Aktivität nachgewiesen (vgl. Abb. 5 D). Auch in den daraufhin untersuchten hochgereinigten Se-Gpx-Chargen, die ursprünglich mit H2O2 spezifische Aktivitäten um 500 bis 800 U pro mg Protein und nach mehrjähriger Lagerung zum Zeitpunkt des Tests 3 bis 14 U/mg aufwiesen, ließ sich im literaturüblichen GST-Test nach Abzug der Spontanreaktion durchgehend eine geringe GST-Aktivität von 5 mU/mg nachweisen.Bei Anionenaustauschertrennungen von 105 000g Überständen werden ca. 1 bis 3 % der aufgetragenen GST-Volumenaktivität mit CDNB zusammen mit der Se-GPx-Aktivität coeluiert.

Die 105 000 g Überstände von 120 Tage mit pulverförmiger supplemetierter und Selenmangel - Diät ernährter Mäuse weisen 6 Stunden nach Markierung deutliche Unterschiede hinsichtlich der Radioktivitätsverteilung auf, wenn diese mittels Ionenaustausch - FPLC getrennt werden. Während der bei 0,15 M NaCl eluierte Radioaktivitätspeak bei (Se-)Überständen weitgehend verschwindet, ist eine deutliche Zunahme der bei 0,32 M NaCl eluierten Aktivität zu beobachten (vgl. Abb. 6).

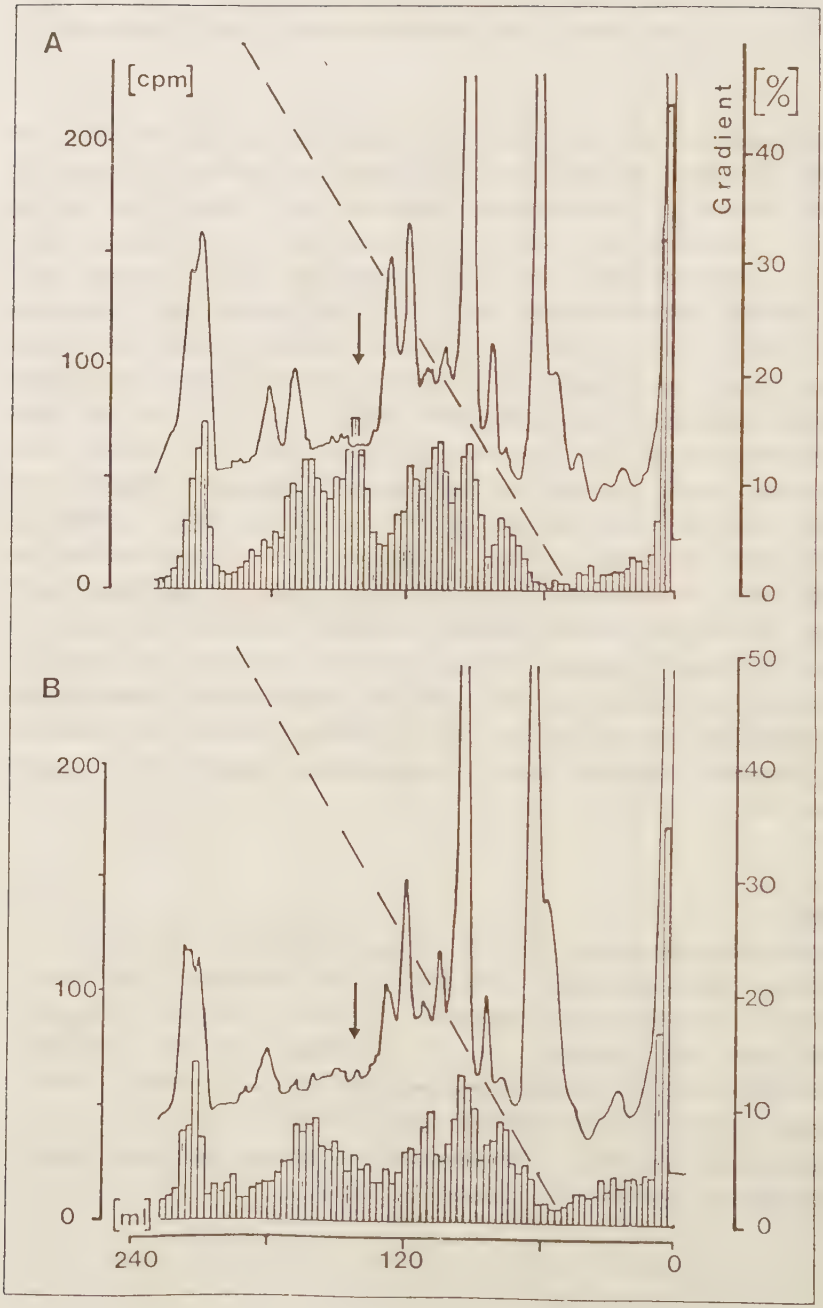
Abb.6:
Elutions- und Aktivitätsprofile an Ionenaustausch-FPLC getrennter 105 000 g Überstände der Lebern von Se-supplementierten (A) und Se-deficienter Mäuse (B) nach 6 h in vivo Markierung: Extinktion (———), Gradient (— — —), Gamma - Aktivität (▥▥▥). Fraktionen a 3,2 ml, übrige Trennparameter wie in der Legende zu Abb. 5.


A
[cpm]
Radioaktivität
500
0
E 280
0
[%]
Gradient
80
60
40
20
0
B
500
0
80
60
40
20
0
[ml]
240
120
0

4.4.2.2. Versuch der Hemmung des Einbaus von 75Se-Aktivität in 105 000 g Überstand-Proteine durch Cycloheximid

Nach zweimaliger Gabe von 83 µg Cycloheximid/kg erhöht sich bei 60 d diätierten Tieren der nicht fällbare Anteil der in den 105 000 g Überständen nachweisbaren 75Se-Aktivität um ca. das Doppelte: Von 7,3 ± 1,4 % auf 14,4 ± 1,4 % (jeweils n=3). In dieser Hinsicht bestehen keine diätisch begründeten Unterschiede: Der mit 25 %-igem TCA fällbare Anteil der Aktivität ist in beiden Gruppen trotz der hohen CHI-Dosierung erstaunlich groß. Die Elutionsprofile der FPLC-Anionenaustausch-Trennunungen belegen, daß von der CHI- Behandlung nicht alle markierten Fraktionen gleichmäßig betroffen sind, und daß bei Auftragung kleinerer Volumina das 75Se-Radioaktivitätsprofil sich weitaus komplexer darstellt (vgl. Abb. 7). Von der CHI - Hemmung am stärksten betroffen und fast vollständig verschwunden ist bei Mangeltieren der bei 0,32 M NaCl eluierte Peak (entspricht Nr.1 der elektrophoretischen Trennung: 54 kDa-Protein), während bei supplementierten Mäusen der markanteste Unterschied neben einer allgemeinen Erniedrigung der gefundenen Aktivität beim mit 0,15 M NaCl von der Säule freigesetzten Fraktion zu beobachten ist.

Abb.7:
Polyanion getrennte 105 000 g Leberüberstände von 60 d mit der pulverförmigen Diät ernährten (Se-)-Mäusen: 6 h Markierung mit 75Se-Natriumselenit ohne (A) und mit CHI-Hemmung (B). Ektinktion (———), Gradient (– – –), Radioaktivität (▥). Gekennzeichnet ist die bei 0,32 M NaCl eluierte CHI-sensitive Fraktion.
Auftragung: 0,5 ml, Fraktionen a 2,8 ml; alle anderen Trennparameter wie in der Legende zu Abb. 5.


A
[cpm]
200
100
0
Gradient
[%]
40
30
20
10
0
B
200
100
0
[ml]
240
120
0
50
40
30
20
10
0

4.4.2.3. Ionenaustausch-Chromatographie in vitro markierter Überstände

Kalte 105 000 g Überstände, die 30 min bei 37°C mit (75-Se)-Natriumselenit inkubiert wurden, liefern bei der Trennung an Polyanion Si 17, ein von den in vivo markierten Cytosolen in folgenden Punkten abweichendes Radioaktivitätsprofil:

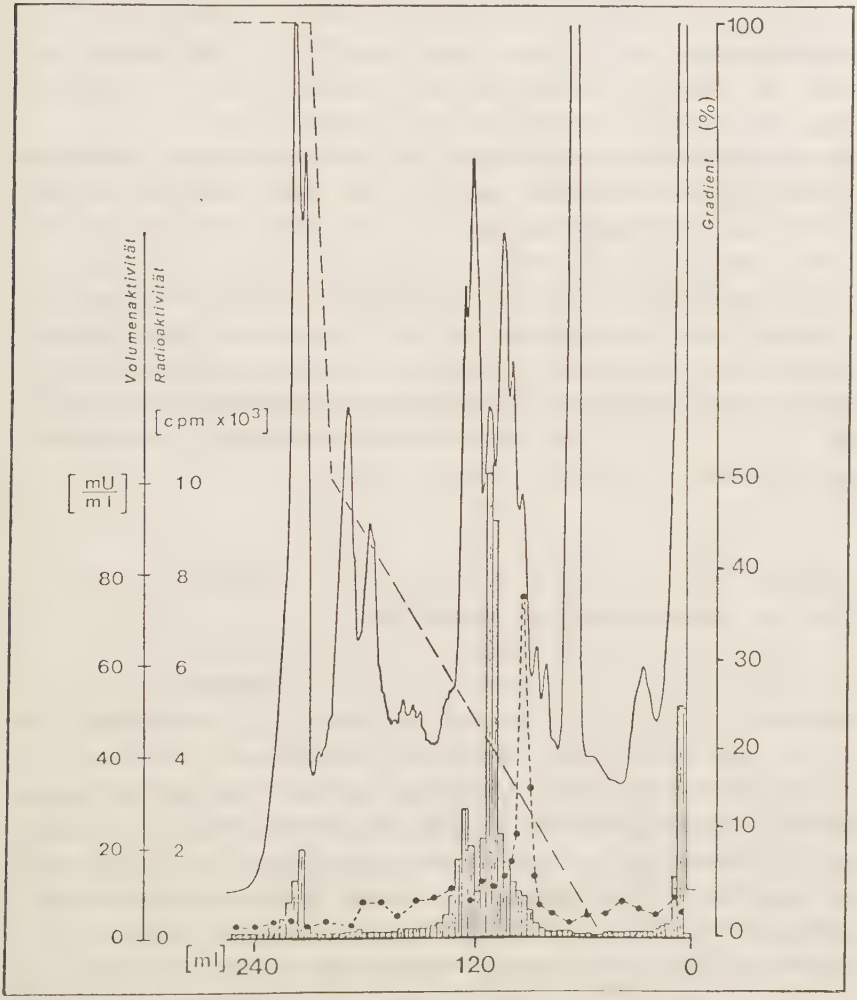


Abb. 8:
Anionenaustausch-Trennung in vitro markierten Lebercytosols der Maus: Extinktion (——), Radioaktivität (▥▥▥), Se-GPx-Aktivität (●--●), Fraktionsgröße: 3,2 ml, Laufbedingungen vgl: Abb.4

Während markierte Peaks, die bei in vivo Labeling mit 0,15 und 0.32 M NaCl eluiert werden, fehlen, erscheinen 2 neue Peaks bei 0,2 und 0,27 M NaCl.
Ein weiterer Unterschied ist bei der Fällung dieser Peaks zu beobachten: Während sich der in vitro markierte radioaktive Peak bei 0,2 M NaCl nur zu 15 % und und der bei 0,27 M NaCl lediglich zu 5 % mit 25 %-iger TCA fällen lassen, beträgt der fällbare Anteil der in vivo markierten Proteine in diesem Bereich des Elutionsprofils jeweils > 80 % :
Nach TCA-Fällung verbleiben bei in vivo markierten Cytosolen 84 % der Radioaktivität bei 0,15 M NaCl und 87 % bei 0,32 M NaCl im Niederschlag.

Keine Unterschiede zwischen in vivo und in vitro markierten Cytosolen sind demgegenüber bei der Fällbarkeit der Radio - aktivität zu beobachten, die bei 0 bzw. zwischen 0,5 bis 1 M NaCl eluiert wird: Die in Fraktion 2 nachweisbare Aktivität läßt sich zu 65 % und die bei hoher Salzkonzentration eluierte zu über 90 % fällen (jeweils n=2).

4.4.2.4. Molekularsieb-Chromatographie

Der Versuch die nativen Molekulargewichte markierter Selenoproteine in den in vivo markierten 105 000 g Überständen mit FPLC an Sepharose12 von Pharmacia zu bestimmen, lieferte insofern unbefriedigende Ergebnisse, da das Trennvermögen dieser Säule sich gerade im Bereich von 40 bis 90 kDa als ungenügend herausstellte: Unter Versuchsbedingungen betrug die Trennschärfe von Proteinen in diesem Bereich bestenfalls ±10 kDa.
Unter Berücksichtigung einer großen Fehlerbreite kann jedoch beobachtet werden, daß ohne Ansehen des Selenstatus der über-

wiegende Anteil des im Überstand vorhandenen Markers 6h nach i.p. Aplikation der Tracerdosis von (75Se)-Natriumselenit im Bereich von 50 bis 90 kDa eluiert wird.

4.4.3. L-(U-14C)-Leucin markierte 105 000 g Überstände

In Lebern von Mäusen, die 100 d mit der pulverförmigen Diät ernährt worden sind, lassen sich, 15 min nach i.p. Applikation von 5 µCi L-(U-14C)-Leucin vom Selenstatus nicht beeinflußt 3,3 ± 0,2 % der Dosis im Cytosol nachweisen (n=4). 70,5 ± 3,5 % dieser Aktivität läßt sich mit 25 %-iger TCA fällen (n=4).
Unterschiede in den 14C -Radioaktivitätsprofilen der Ionenaustausch-Trennungen selendeficienter und supplementierter Mäuse sind nicht beobachtet worden.

4.4.4. 75Se und 14C doppelmarkierte 105 000 g Überstände

4.4.4.1. Ermittlung der Beta-Aktivität doppelmarkierter Ansätze

Wegen der in der Abb.9 dargestellten Überlappung der Energiespektren der β-Aktivitäten von 75Se und 14C, die zudem Quench-abhängig sind, wurde nach Messung der Gamma-Strahlung der Proben, der Bestimmung der Gesamt-Beta-Aktivität und den Zählraten für die beiden Counter unter Versuchsbedingungen die reine 14C-β-Aktivität nach 3.2.2.4. berechnet.

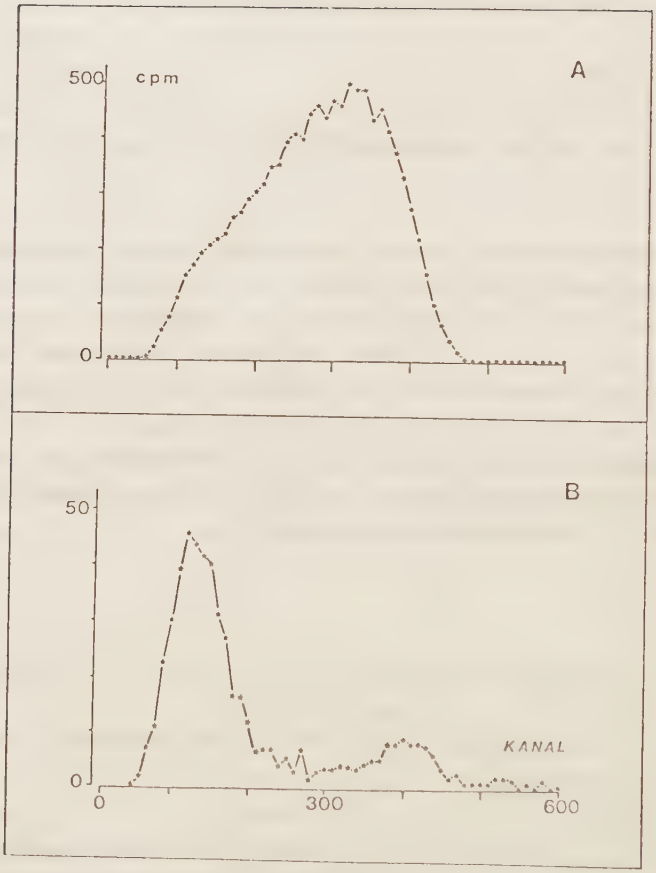


Abb. 9:

ß-Energieverteilungsspektren von Cytosol-gequenchten 14C- (A) und 75Se-Standards (B)

4.4.5. (75Se)-Natriumselenit und L-(U-14C)-Leucin doppelmarkierte 105 000g Überstände

Die 105 000g Überstände der Lebern von nach 3.2.2.3. doppelmarkierten Se-supplementierten und selendeficienten Mäusen weisen nach 66-tägiger Diätierung vergleichbare Beta- und Gamma- Aktivitäten auf (Mittelwerte aus jeweils 2 Tieren):

	75Se- Gamma- Aktivität		14C- Beta-Aktivität	
	Se+	Se-	Se+	Se-
absolut	25300	27120	501500	503500
pro mg Protein	243	259	4813	4786

Während die Gamma-Aktivität in den 105000g Überständen sich mit 25 %-iger TCA fast vollständig fällen läßt, verbleiben von der bereinigten 14C-ß-Aktivität nach TCA-Behandlung und Zentrifugation unabhängig vom Selenstatus 18 ± 4,9 % (n=4) im Überstand. Ebenfalls unabhängig von der Diät ist die 14C-Aktivität, die 15 min nach Applikation im Cytosol meßbar ist: 4,6 ± 0,5 % (n=4) der injizierten 14C-Aktivität.

Bei weitgehender Übereinstimmung der Elutionsprofile der doppelmarkierten Cytosole ist der erhöhte spezifische Einbau von Gamma- und Beta-Aktivität in die Proteinfraktion, die bei selendeficienten Tieren vom Anionenaustauscher bei 0,32 M NaCl eluiert wird, deutlich (vgl. Abb. 10).

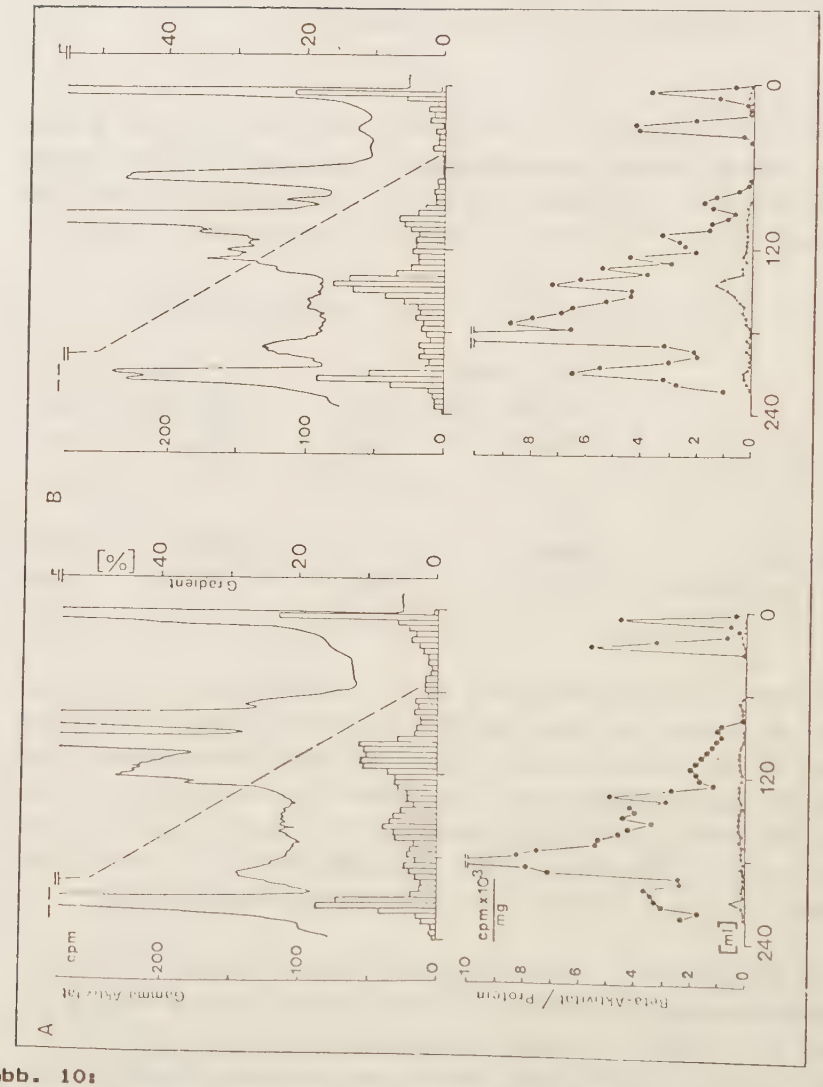


Abb. 10:
Ionenaustauscher-Trennung 14C-Leucin und 75Se-Natriumselenit markierter Lebercytosole (1 ml) selensupplementierter (A) und selendeficienter Mäuse (B): Extinktion (——), Gamma-Aktivität der Fraktionen, absolut und nicht normiert (▯▯▯), um den 75Selen-Anteil bereinigte spezifische 14C-ß-Aktivität (●—●—●), spezifische Gamma-Aktivität (*—*—*), Fraktionsgröße = 4 ml, für weitere Trennparameter vgl. Abb. 5.

4.4.6. SDS-PAGE von 75Se-markierten und angereicherten Ionenaustauscher-Fraktionen

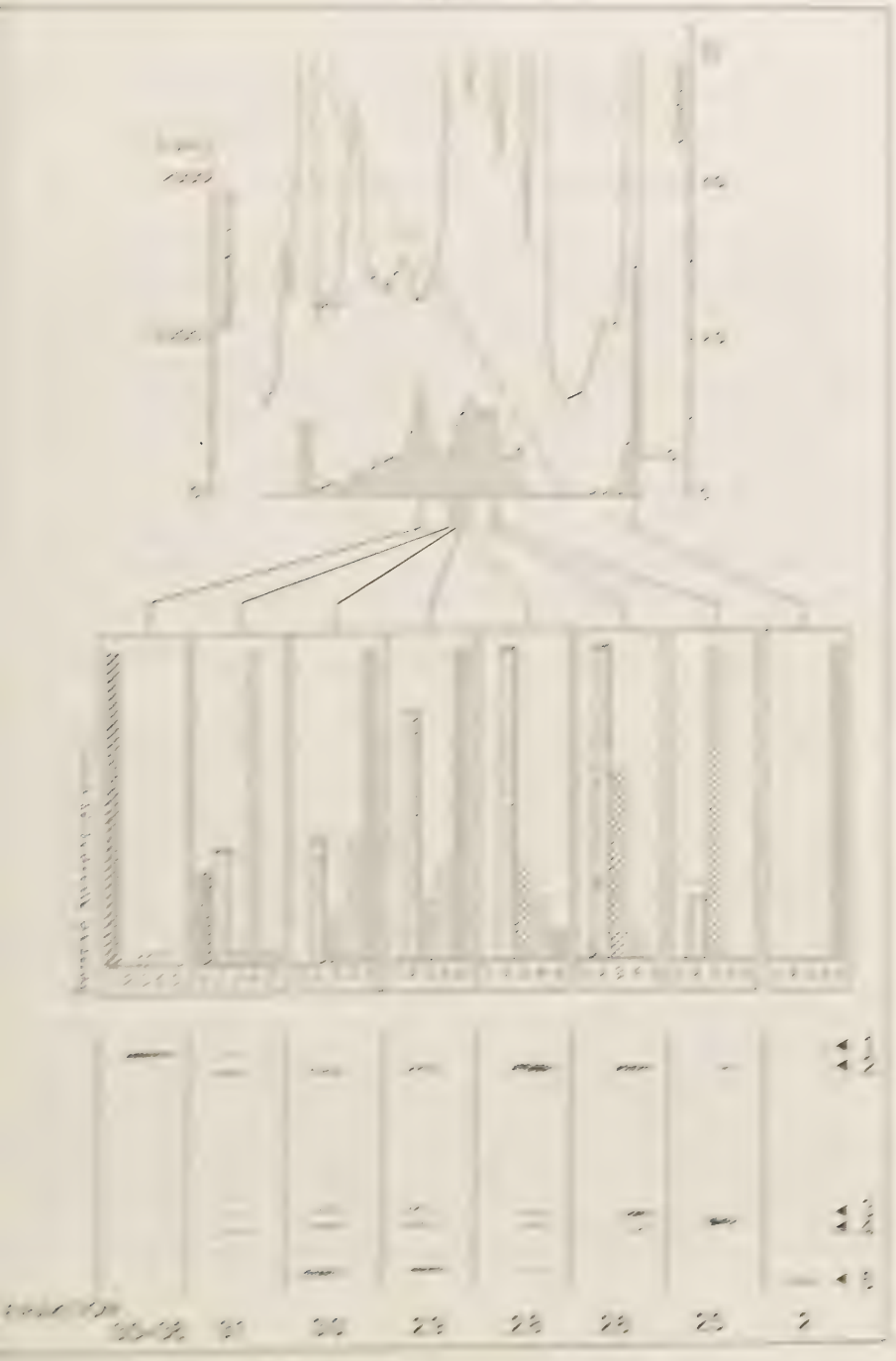
Die Anreicherung der markierten Fraktionen der durch Ionenaustausch an Polyanion Si 17, um genügend Materil für Elektrophoresen zu gewinnen, wurde durch Fällung mit 80 %-iger EtOH oder wahlweise durch Zentrifugation in Amicon-Konzentratoren erreicht. Die Linear-Analyser-Daten der SDS-PAGE-Gele liefern die Basis für eine qualitative Beobachtung,die durch die Autoradiographien unterstützt wird (vgl. Abb.11):

Die scheinbar getrennten radioaktiven Peaks im Gradientenbereich 0,15 bis 0,40 M NaCl enthalten bei Se-Mangeltieren 5 Proteine bzw. Proteinuntereinheiten, die sich schwerpunktsmäßig auf die 2 Hauptpeaks in diesem Bereich verteilen. Die Re-Chromatographie des bei 0,32 M NaCl von der Polyanion-Säule gewaschenen Peaks führt zur erneuten Elution des Hauptpeaks an der gleichen Position bei 0,32 M NaCl,mit geringerem Radiaktivitätsbeitrag bei 0,15 M NaCl. Die SDS-PAGE des angereicherten Peaks und die Autoradiographie beweisen, daß der Peak bei 0,32 M hauptsächlich das Protein Nr. 1 mit dem Molgewicht von ca. 54 kDa enthält. Zu sehen sind jedoch auch geringfügige verunreinigende Reste der früher eluierten Proteine/Protein-UE Nr. 3 und 4 mit den Molekulargewichten um 23 und 20 kDa (vgl. Abb.11 und Abb.4). Fraktion Nr. 2 der Austauschertrennung enthält neben nicht fällbaren niedermolekularen Verbindungen das kationische Protein/Protein-UE Nr.5 (12±3 kDa). Eine niedermolekulare Komponente mit anscheinend gleicher Größe wird jedoch auch bei 0,25 M NaCl freigesetzt. Etwas früher, um 0,20 M NaCl, wird als Hauptkomponente Nr. 2 mit dem Mol-Gewicht 46 kDa

von der Säule gewaschen. Der bei 0,15 M NaCl eluierte Peak beinhaltet als markierte Komponente das Protein bzw. die

Protein-UE Nr. 3 (Se-GPx-UE, 23 kDa) neben Nr. 2 (20 kDa). Dieses koplexe Elutionsprofil faßt die Abb. 11 zusammen: Neben den Elutions- und Radioaktivitätsprofilen werden die relativen Konzentrationen aus den Linear-Analyser-Daten zweier SDS-PAGE-Gele in einer halb-quantitativen Schätzung, wobei der Hauptpeak der betreffenden Spur als 100 % - Referenz gesetzt wird,und die zugehörigen Autoradiographien gegezeigt.

Abb. 11:
Elutions- und Radioaktivitätsprofile von 6 h in vivo mit 75Se markiertem, angereichertem und an Ionenaustauscher getrenntem Leber 105 000 g Überstand aus 120 d diätierter (Se-)-Maus (oben); Relative Konzentrationen der markierten Komponenten in den zugehörigen Fraktionen (Mitte) und die zugehörigen Autoradiographien der SDS-PAGE getrennten Fraktionen (unten). Laufbedingungen, Symbole und Numerierung der Komponenten : vgl. Abb. 4 und 5.



5. D I S K U S S I O N

5.1. Zum Selenstatus der Versuchstiere

Diese Studie wurde an männlichen Mäusen, bei denen ein definiert-"chronischer" und kontrollierter Selenmangel durch spezielle Diätierung hervorgerufen war,durchgeführt.In diesem Zusammenhang wird mit "akutem" Selenmangel diejenige Stoffwechsellage gekennzeichnet, die durch einen moderaten Mangel an Spurenelement zu einer schnellen Aktivitätsabnahme der Se-GPx führt, ohne die übrigen modifizierbaren Aktivitäten im nennenswerten Umfang zu beeinflussen. Diese weitere, drastischere Modifikation durch strikteren Se-Mangel wird "chronisch" genannt und kennzeichnet die Stoffwechsellage der zur Markierung eingesetzten Tiere. Aus Kostengründen wurde für diese Studie bei 20 g wiegenden Mäusen zunächst mit käuflichen Diäten ein akuter Se-Mangel hervorgerufen, um sie dann mit dem pulverförmigen Diät in den chronischen Mangelzustand zu überführen.Ab dem 90. Tag der Diätierung wiesen die Tiere bei verschwindend geringer Se - GPx - Aktivität eine über das bisher berichtete Ausmaß hinausgehende ca. 3-fache Auslenkung der GST-Aktivität mit CDNB auf (50). Die spezifische LDH-Aktivität war bei den Mangelmäusen nach 120 Tagen gegenüber den Kontrollen signifikant auf ca. 80 % erniedrigt. Die Körpergewichte der Mangeltiere lagen nicht signifikant, jedoch durchgehend unter denen der supplementierten Tiere.Die Leber -Körpergewichts-Relation, die anfangs zuungunsten der (Se-)-Tiere lag, entwickelte sich ca. ab dem 100. Tag der Diätierung zu ihren Gunsten. Der Proteingehalt der Mangeltierleber am 120. Tag der Diätierung war zwar erhöht, jedoch nicht signifikant.

5.2. Spezifische Markierung von Se-Proteinen mit 75Se-Natriumselenit

Die Möglichkeit der nicht-spezifischen Markierung der Proteine durch unphysiologischen Einbau von Selen anstatt Schwefel sollte durch die Gabe einer Tracer-Dosis von 10 µg Se / kg (0,35 bis 0,45 µg absolut pro Maus) eingeschränkt werden. Nach einer Schätzung beträgt der Se-Gehalt einer ausgewachsenen Kontrollratte ca. 130 µg, während eine chronisch-Se-deficiente Ratte ca. 30 µg Se enthält (80).
Unter Vernachlässigung eventueller spezies-spezifischer Unterschiede wird der Se-Gehalt der hier eingesetzten Mäuse auf 10 µg (Se+) bzw. 3-4 µg (Se-) geschätzt. Somit wurden bei den Markierungsstudien einer Mangelmaus ca. 10 % des Gesamtkörperselens appliziert. Eine geringere Dosierung war aus folgenden Gründen nicht möglich bzw. nicht gewünscht:

1. Diese Studie sollte mit den vorangegangenen umfangreichen Arbeiten der Arbeitsgruppe vergleichbar sein und an deren Ergebnisse anschließen (vgl. 50,51,59).
2. Ohne nicht vertretbar hohe Kosten für eine Sondersynthese waren in Europa keine 75Se-Natriumselenit-Chargen mit höherer spezifischer Aktivität als die in dieser Studie eingesetzten erhältlich, sodaß eine geringere Dosierung an Se eine glaubwürdige Detektion verunmöglicht hätte.

Der Mechanismus des Selen-Einbaus in Proteine der Nagetiere -hauptsächlich an der Se-GPx der Rattenleber studiert- ist umstritten: Das Konzept der Proteinbiosynthese mittels einer spezifischen Selenocysteinyl-tRNA (88, 89) und das der post-translationalen Modifikation der Serin-Reste eines 'Präproteins' mit anorganischem Selen stehen sich ungeklärt gegenüber (90). Deshalb wurde der Bedeutung des unspezifischen Einbaus

von Selen in Konkurrenz zu dem verwandten Element Schwefel besondere Bedeutung geschenkt.

Der unspezifische Einbau von Se in S-Proteine wird dann erwartet, wenn die Konzentration der Se-Komponenten größer ist als die der S-Analoga. Unter normalen Bedingungen übertrifft die Schwefel-Konzentration in der Zelle die von Selen um mehrere Größenordnungen (58). Einer Verarmung an Schwefelaminosäuren wurde durch die Supplementierung der Diät mit 0,3 % Methionin begegnet. Ohne Berücksichtigung der Bioverfügbarkeit nimmt somit eine Maus bei einer täglichen Futteraufnahme von 3-5 g täglich ca. 100-150 µg Methionin auf.

Ein weiterer kritischer Punkt beim Studium der Synthese von Selenoproteinen besteht in der Aussagefähigkeit von Hemmversuchen der Proteinbiosynthese. Zwei publizierte Beispiele mögen dies verdeutlichen:

1.- Burk und Gregory isolierten aus Plasma und Leber chronisch Se-deficienter Ratten mittels einer Tracerdosis 75Se-Natriumselenit und durch Säulen-chromatographische Methoden ein 75Se-P benanntes Protein mit dem Molekulargewicht von von 79 kDa. Während sich mit CHI die Synthese dieses Proteins im Rattenplasma hemmen ließ, konnte über die Leber-75Se-P keine eindeutige Aussage gemacht werden (61).

2.- Motsenbocker und Tappel wiesen ein Protein von 80 kDa, mit einer Selen als Se-Cys enthaltenden UE von 45 kDa, im Plasma von Ratten im akuten Se-Mangel nach. Die Biosynthese dieses Proteins konnte in aus normal-ernährten Rattenlebern gewonnenen Gewebeschnitten durch CHI vollständig gehemmt werden (62). In einer weiteren Publikation korrigierten die Autoren die Molgewichte der in SDS dissozierten UE auf 53 kDa und 35 kDa (91).

5.3. Die Detektion der 75Se- Aktivität in biologischen Proben

Die geringsten zu messenden 75Se-Aktivitäten lagen, bei einer Untergrundstrahlung von 50 ± 2 cpm,um die die Meßergebnisse geräteintern bereinigt wurden,in den markierten Peaks der analytischen FPLC-Läufe als ca. das 4 bis 5-fache der abgezogenen Strahlung vor. Das Rauschen der nicht markierten Proben betrug bei einer Zählzeit von 10 min 3±3 cpm, weshalb durchgehend die langen Zählzeiten in Kauf genommen wurden. Entsprechend lange Lagerungen von 20 bis 60 d waren ebenfalls für die Autoradiographien vonnöten.
Die Messung der ß-Aktivität der 75Se-markierten und elektrophoretisch getrennten Komponenten stellt höchste Ansprüche an die Gele, da durch das 1 mm breite Zählfenster eine extrem schmale Linie der Laufspur erfaßt wird, sodaß geringste Verschiebungen quer zur Laufstrecke erheblichen Einfluß auf die Resultate haben. Deshalb wurden die auf diesem Wege gewonnenen Ergebnisse aus zwei unabhängigen, um 2 mm parallel-verschobenen Zählungen pro Spur nur für halbquantitative Betrachtungen herangezogen und an den Autoradiographien überprüft.

5.4. 75Se-Aktivität in den Lebern und zellulären Fraktionen

Da der überwiegende Anteil der in der löslichen Fraktion der Leber nachweisbare 75Se-Aktivität mit Alkohol bzw. mit Säure fällbar ist und aus Homogenaten nur ein verschwindend geringer Anteil (<1 %), wie auch für die Ratte gezeigt (63), sich mit Chloroform/Methanol extrahieren läßt, liegt nach einer Markierungsdauer von 6h nahezu die gesamte Radioaktivität proteingebunden vor.

Die pro g Maus applizierte Dosis und die mit der Dauer der Diätierung sich zugunsten der Mangeltiere entwickelnde Leber-Körpergewichts-Relation bieten eine mögliche Erklärung für die in den Lebern der chronisch-selendeficienten Tiere signifikant erhöhten 75Se-Aktivitäten. Eine signifikante, allgemein-gesteigerte Proteinbiosynthese infolge des chronischen Selenmangels konnte mit der 15 minütigen 14C-Leucin Markierung nicht festgestellt werden.

Signifikant erhöht ist ebenfalls die in den Mikrosomen gebundene 75Se-Radioaktivität. Demgegenüber erweist sich die in den 105 000 g Überständen der Mangeltiere erhöhte 75Se-Aktivität als nicht signifikant. Burk und Gregory berichten, daß sie bei chronisch-deficienten Ratten in dieser Fraktion 1 bis 72 h nach Applikation eines Tracerdosis des radioaktiven Markers einen gegenüber den Kontrollen verminderten 75Se-Gehalt gefunden hätten, wobei die Autoren ihre Daten als Prozent der im Homogenat nachgewiesenen Radioaktivität ausgedrückt haben.Die Bezugsgrößen variieren zwischen 24 und 44 µCi; eine eventuelle, nicht-zufallsbedingte Verteilung der Daten ist nicht diskutiert. Die Größe der Lebern und die Proteinkonzentration in den isolierten Fraktionen sind nicht angeführt (61).

Die von der Diätierung bedingten Unterschiede in der Cytosol-Fraktion betreffen bei den hier untersuchten Mäusen die Verteilung der eingebauten 75Se-Aktivität in die nach ihrer Ladung getrennten Proteine. Da bei supplementierten Tieren der markanteste präcipitierbare 75Se-Peak

1-mit der Se-GPx-Aktivität coeluiert wird,

2-diese Fraktion nach Reduktion und SDS-PAGE eine markierte Hauptbande bei 23 kDa aufweist,

3-diese Fraktion bei Mangeltieren mit abnehmender Se-GPx-Aktivität mit Wasserstoffperoxid einen geringeren Anteil an 75Se enthält,

wird gefolgert, daß es sich bei der von der Polyanion-Säule bei 0,15 M NaCl freigesetzten 75Se-markierten Komponente um Se-GPx und bei dem Proteint Nr. 3 der Autoradiographien um ihre UE mit dem Molekulargewicht von 23 kDa handelt.

Bei Se-Mangeltieren ist die 23 kDa Polypeptid-UE der Se-GPx schwächer radioaktiv markiert. Die bei 0,15 M NaCl eluierte Fraktion enthält bei deficienten Mäusen jedoch bereits das Protein Nr. 4 der SDS-PAGE-Trennungen, dessen Hauptanteil bei der Anionenaustauscher-Trennungen nach der Se-GPx eluiert wird. Die Komponente Nr. 4 mit einem Mol-Gewicht von 20 kDa ist bei Mangeltieren stärker markiert.

Da

1- die eine geringe Se-GPx-Restaktivität bei FPLC-Ionenaustauschertrennungen nach dem Hauptpeak mit ausgedehntem Tailing frei gesetzt wird,
2- bei der Reinigung dieses Proteins aus Rindererythrocyten eine Leader-Sequenz von 9 Aminosäuren häufig und leicht abgepalten wird (56, 120),
3- bei SDS-elektrophoretischen Trennungen der aus Rindererythrocyten hochgereinigten (spezifische Aktivität > 0,5 kU/mg), gelagerten und reduzierten Se-GPx-Chargen eine Nebenbande bei 20 kDa nachgewiesen wird,
4- für die PIP mit einem Mol-Gewicht von ca. 20 kDa, einem der Se-GPx funktionell verwandten Protein mit etwas modifizierter Substratspezifität,Sequenzhomologien mit der Se-Gpx aufgezeigt sind (119),
5- mit der Se-GPx eine GST-Aktivität mit CDNB coeluiert wird,
6- verschiedene Formen der Se-GPx beobachtet worden sind (siehe unten),

erhebt sich die spekulative Frage, ob diese GSH-abhängigen Enzyme nicht verwandt sind. Ein gemeinsames Präprotein, daß auch die GPx-Tetramere darstellen könnte, böte eine Erklärung für die Überschneidungen. Eine alternative Er-

klärung bieten die zahlreichen Beobachtungen, daß die Se-GPx-Enzymaktivität z.B. in der Rattenleber und in den Erythrozyten des Menschen in mehreren Formen vorliegt, die nach Ladung (81 - 84, 63) und Hydrophobie (85) discriminiert werden können. Postuliert ist auch eine Se-GPx in Rattenleber-Mitochondrien, die sich von der cytosolischen unterscheidet (86). Eine endgültige Antwort auf die Herkunft und die mögliche Bedeutung des in der Leber der selendeficienten Maus zum ersten Mal beobachteten Se-enthaltenden 20 kDa Komponente kann die Reinigung und Aufklärung der Aminosäuresequenz bieten.
Eine Se-Protein-UE von 20 kDa haben Motsenbocker und Tappel bei der Ratte in der Niere und Skelettmuskulatur nachgewiesen, jedoch bei zwei verschiedenen Experimenten mit akut deficienten und normal-ernährten Tieren in der Leber nicht detektieren können (87,63).

Die bei 0,32 M NaCl von der Ionenaustauschersäule eluierte radioaktive Fraktion mit dem 54 kDa Se-Protein (SDS-PAGE Protein Nr.1) verdient insofern besondere Beachtung, da

1-die Synthese dieser markierten Komponente durch CHI gehemmt wird,
2-in dieses Protein bei Mangeltieren verstärkt ^{75}Se aus Natriumselenit eingebaut
3-und in diese Fraktion parallel zum gesteigerten Se-Aufnahme mehr ^{14}C-Leucin eingebaut wird,

Es lassen sich 2 Fraktionen im Elutionsprofil nachweisen, die eine niedermolekulare Komponente mit einem Molekulargewicht von 10-15 kDa enthalten (Nr. 5 bei der SDS-PAGE), die vom Austauscher bei 0 und 0,2 M NaCl eluiert wird. Ob diese Polypeptide identisch sind und lediglich zwei La-

dungszustände des gleichen Proteins oder die UE eines labilen Proteins, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Aufarbeitung dissoziiert, darstellen, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden.
Whanger et al. berichteten 1973 von einem 10 kDa Selenoprotein aus der Muskulatur des Lamms. Die spektralen Eigenschaften dieses Proteins, das ein Häm pro Molekül enthielt, ähnelten dem des Cytochrom c und die Aminosäurezusammensetzung glich der des Cytochrom b5 (92).
Auch im Skelettmuskulatur- und Testes-Cytosol der Ratte liegt nach Beilstein und Whanger als Haupt-Se-Protein ein niedermolekulares Polypeptid vor, das sie in der Leber und Niere nicht detektierten (93).

Der radioaktive Peak der mit dem zweiten steileren Gradienten bei 1 M NaCl eluiert wird, verschwindet weitgehend, wenn der erste langsamere Gradient auch nach 0,5 M NaCl weiter fortgesetzt wird. Es wurde nicht untersucht, ob mit 1 M NaCl eine weitere, spezifisch markierte Komponente freigesetzt wird.

Für alle Fraktionen, die mit der Anionenaustauschersäule gewonnen wurden, gilt, daß diese keine isolierten Proteine enthalten, sondern vielmehr ein Gemisch von 10 oder mehr Protein- UE. Aus diesem Grunde und weil in einem engen Gradientenbereich 5 spezifisch-markierte Proteine eluiert werden, ist der Aussagewert der Studien, die ihre Aussagen mit nur aus Ionenaustauscher- und/oder Gelfiltrationstrennungen gewonnenen Daten begründen, begrenzt und kann wegen der Komplexität der Elutionsprofile zu widersprüchlichen Interpretationen führen.

Zusammengefaßt: Diese Studie zeigt zum ersten Mal, daß in einer Tracerdosis angebotenes Selen in der Leber der chronisch- Se-deficienten Maus, wie auch bei der Ratte,

im Gegensatz zu supplementierten Tieren vorwiegend in andere Proteine als die Se-GPx eingebaut wird und daß bei der Mangelmausleber bei einem limitierten Angebot an Selen als Haupt-Se-einbauende Polypeptide 4 Komponenten mit Mol- Gewichten von 13 kDa, 20 kDa, 48 kDa und 54 kDa entstehen. Es ist gesichert, daß die Bildung des 54 kDa Polypeptids durch die Hemmung der Proteinbiobiosynthese verhindert wird. Es wurde wahrscheinlich gemacht, daß die Ursache der beobachteten Unterschiede nicht in einer allgemein gesteigerten Proteinbiosynthese, sondern in einer Spurenelement-abhängigen Modifikation des Proteinmusters begründetet ist. Zwei weitere Beobachtungen sind hilfreich bei der Interpretation der bisher publizierten Untersuchungen:

1-Es sind auch bei geringen Selen-Dosierungen, zumindest bei der Leber Selen-deficienter Mäuse, mehr als ein mit der Se-GPx um das Spurenelement konkurrierendes Protein zu erwarten.
2-Proteinbiosynthesehemmer - sensitive und nicht-sensitive Prozesse laufen beim Einbau von Selen in die Leberproteine der Maus synchron ab.

Nachdem in dieser Studie eine genaue Übersicht der bei chronisch-selendefizienten männlichen Mäusen mit einer Tracerdosis 75Se-Natriumselenit spezifisch-markierbaren Proteine und ein schneller Weg für ihre Anreicherung und ihren effektiven Nachweis erarbeitet und beschrieben wurde, kann als weiterer Schritt die Reinigung und Aufdeckung der Aminosäuresequenz und der Proteinstruktur der hochgereinigten Komponenten Informationen über die Struktur-Funktions-Beziehungen von Selen im Organismus liefern.

5.5. Hypothesen zum Mechanismus der Stoffwechselregulation durch Selen

Die der Stoffwechselmodulationen im Selenmangel zugrunde liegenden Mechanismen werden auf der Grundlage von indirekten Beweisen kontrovers diskutiert. Der Stand der Diskussion ist 1984 von Reiter ausführlich dargestellt worden (101) und soll hier nur in den Grundthesen dargelegt und um neuere Aspekte der Selenmangelstudien ergänzt werden.

Die Vielfalt der beim Mangel von Selen beobachteten Effekte, Symptome und spezies-spezifischen Krankheitsbilder deuten auf eine durch den Mangel am Spurenelement hervorgerufene Dysregulation auf zentraler Ebene des Stoffwechsels hin.

Postuliert sind zwei potentielle Funktionen von Selen, die geeignet wären, modulierend in den Gesamtstoffwechsel einzugreifen. Postuliert ist somit auch je nach Standpunkt:

a. Ein Se-enthaltender Faktor, der nicht die Se-GPX ist und der regulierend in transcriptive oder translationale Prozesse eingreift,
b. Eine Rest-Se-GPx-Aktivität, die auch einem spezialisierten Se-GPx-Pool gehören könnte, oder andere funktionell verwandte Se-Proteine, die verantwortlich für die Aufrechterhaltung des physiologischen Redoxzustandes ('Peroxid-Tonus') sind.

Ein gewichtiges Gegenargument gegen das Vorliegen einer unspezifischen Lipidperoxidation lieferte die Beobachtung, daß auch im chronischen Se-Mangel die Fluidität und der Sätti - gungsgrad biologischer Membranen nicht betroffen ist(59).Aufgrund der bei der Aufklärung der oxidativ gebildeten Arachidonsäure-Metaboliten in den letzten Jahren gemachten Fortschritte muß die Bedeutung des 'Peroxid-Status' der Zelle erneut diskutiert werden.

Neben ihrer Bedeutung für entzündliche Prozesse werden die Arachidonsäure-Metaboliten heute als Gewebshormone und 'Signalstoffe' des nicht-pathologischen Stoffwechselgeschehens eingestuft,die der regulierten Kommunikation zwischen den Zellen multizellulärer Systeme dienen (102). In die zellartspezifische Ausprägung und Modifizierung der Produkte der Arachidonsäure greifen u.a. die Se-GPx und eine oder verschiedene GST ein. Bei Se-Mangel sind folgende Effekte bei Prostaglandinen, Leukotrienen und Lipoxinen beschrieben:

In Blutplättchen akut-Se-defizienter Ratten wird in vitro die Bildung von 12-HETE aus Arachidonsäure erniedrigt und die von THETE stimuliert (54). Die trihydroxylierten Arachidonsäure-Metaboliten aus Leukocyten des Menschen stimulieren die Superoxid-Anionenbildung bei Neutrophilen und deren Degranulation. Diese neue Klasse der Signalsubstanzen erhielt den Namen Lipoxine (103-105).
Eine Se-Status-abhängige Verschiebung des Thromboxan A2 (TXA2) / Prostacyclin (PGI2)-Gleichgewichts in Blutplättchen und im Aortagewebe wird im Zusammenhang mit Gefäßkrankheiten diskutiert. TXA2 stimuliert, PGI2 inhibiert Plättchen Aggregation (106-111). Es ist gezeigt, daß 15-HPETE die PG- und PGI2-Synthase-Aktivitäten beim Kaninchen in vivo und in vitro reguliert (112). Auch die Aktivität des Schlüsselenzyms der LT-Biosynthese ist Peroxid-reguliert (113). Insofern verdient die von Reiter und Wendel beobachtete signifikante Modifikation des Fettsäuremusters, mit einem erhöhten Arachidonsäure-Gehalt in den mikrosomalen Membranen chronisch Se-defizienter Mäuselebern (59), besondere Beachtung.

In direktem Zusammenhang mit dem Peroxid-Tonus steht der Redox - Zustand biologischer Systeme, z.B. ausgedrückt als das

GSSG /GSH-Verhältnis. Dem Redox-Zustand werden regulatorische Funktionen zugeschrieben, z.B. auf die Aktivität der Enzyme des Pentosephosphat-Weges (114). Über die bei Selen-Mangel gesteigerte Biosynthese und Freisetzung von GSH aus der Leber (32) sind via der Modifizierung von Thio-Gruppen an Membranen modulierende permissive, stimulierende oder hemmende Effekte auf Hormon-Wirkungen und Freisetzung möglich. So ist z.B. beschrieben, daß durch Verschiebung des Redox-Gleichgewichtes und durch verschiedene Thiol-Komponenten die Glucose-stimulierte Insulin-Sekretion moduliert werden kann (115,116). In dieses Bild paßt auch, daß Hydrogenperoxide (117) und GSH (118) in Ratten-Adipocyten auf die Lipid-Synthese eine Insulin-ähnliche Wirkung entfalten.Diese Befunde bieten eine mögliche Erklärung für den im Se-Mangel beobachteten gesteigerten Glucose-Katabolismus.

Im Rahmen dieses Ansatzes würden die spezies- und organ-spezifisch unterschiedlichen Enzymmuster an Se-GPx und an Non-Se-GPx zum einen und die verschiedenen Arachidonsäure-Produktprofile zum anderen die Anfälligkeit unterschiedlicher Organe auf einen Se-Mangel bedingen. Jedoch ist das Wissen sowohl über Zusammenhänge systemischer Regulation als auch über Selenoverbindungen heute noch nicht soweit gediehen, daß eine endgültige mechanistische Erklärung der Selenmangel-Effekte möglich wäre.

6. L I T E R A T U R

1. J. Berzelius, Acad. Hand. Stockholm 39, 13, 1818
2. W.O. Robinson, J. Assoc. Official. Agrical. Chem. 16, 423, 1933
3. K.W. Franke, J. Nutr. 8, 597, 1934
4. A.A. Nelson, O.G. Fitzhugh, H.O. Calvery, Cancer Res. 3, 230, 1943
5. K. Schwarz and C. Foltz, J. Am. Chem. Soc. 79. 3292, 1957
6. Selenium: Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition, I. Rosenfeld, O.A. Beath (eds.), Acad. Press, N.Y. 1964
7. I.T. Tinsley,J.R. Harr, J.F. Bone, P.H. Weswig and R.S. Yamamoto, In: Selenium and Biomedicine , O.H. Muth (ed.), Avi Publishing Co., Westport, pp. 141, 1967
8 J. Pinsent, Biochem. J. 57, 10, 1954
9. W.B. DeWitt and K. Schwarz, Experimentia 14, 28, 1958
10. E.L. Patterson, R. Milstrey, E.L.R. Stockstad, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95, 617, 1957
11. T. Noguchi, A.H. Cantor, M.L. Scott, J. Nutr. 103, 1502, 1957
12. J.N. Thompson and M. Scott, J. Nutr. 97, 335, 1969
13. O.H. Muth, J.H. Oldfield, L.F. Remmert, J.R. Schubert, Science 128, 1090, 1958
14. G.A.M. Sharmon, K.L. Blaxter, R.S. Wilson, Vet. Rec. 71, 536, 1959
15. X. Chen, X. Chen, G. Yang, Z. Wen, K. Ge, Relation of selenium deficiency to the occurence of Keshan disease In: Selenium in Biology and Medicine (J.E. Spallholz, J.L. Martin, H.E. Ganther, eds.), Avi Publ. Co., Westport, CT (USA) 1981, pp. 171

16. M. Dongxu, Third Intern. Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Abstract), Beijing 1984
17. K.E.M. McCoy, P.H. Weswig, J. Nutr. 98, 383, 1969
18. L.H. Sprinkler, J.R. Harr, P.M. Newborne, P.D. Whanger, P.H. Weswig, Nutr. Rep. Int. 6, 335, 1971
19. E. Wallace, G.W. Cooper, H.J. Calvin, Gamete Res. 7, 389, 1983
20. R.C. Bull and J.E. Oldfield, J. Nutr. 91, 237, 1967
21. H. Sies and K.M. Moss, Europ. J. Biochem. 84, 377, 1978
22. J.M. Thompson and M.L. Scott, J. Nutr. 100, 797, 1969
23. R.F. Burk, H.E. Jordan, K.W. Kiker, Tox. Appl. Pharmacol. 40, 71, 1977
24. J. Parizek, J. Kalouskova, J. Benes, L. Pavlik, Ann. N.Y. Acad. Sci. 355, 347, 1980
25. H. Iwata, T. Masukawa, H. Kito, M. Hayashi, Biochem. Pharmacol. 30, 3159, 1981
26. R.F. Burk and B.S.S. Masters, Archs. Biochem. Biophys. 170, 124, 1975
27. S.M. Pilch and G.F. Combs jr., Comp. Biochem. Physiol. 69C, 2873, 1981
28. S. Newman and P.S. Guzelian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2922, 1982
29. P.D. Whanger, P.H. Weswig, O.H. Muth, J.E. Oldfield, J. Nutr. 100, 773, 1970
30. W.C. Fischer and P.D. Whanger, J. Nutr. 107, 1493, 1977
31. W.C. Fischer and P.D. Whanger, J. Nutr. Sci. Vitaminol. 23, 389, 1977
32. K.E. Hill and R.F. Burk, J. Biol. Chem. 257, 10668, 1982
33. M.A. Correia and R.F. Burk,J.Biol. Chem. 253, 6203, 1978
34. A. Wendel, In: "Enzymatic Basis of Detoxication" (W.B. Jakoby, ed.), Acad. Press N.Y. 1980, Vol. I, pp. 333

35. G.A. Pascoe, J. Sakai-Wong, E. Soliven, M.A. Correia, Biochem. Pharmacol. 32, 3027, 1983
36. R.F. Burk, R.A. Lawrence, M.A. Correia, Biochem. Pharmacol. 29, 39, 1980
37. P. Cikryt, S. Feuerstein, A. Wendel, Biochem. Pharmacol. 31, 2873, 1982
38. C.C. Reddy, C.E. Thomas, R.W. Scholz, E.J. Massaro, Biochem. Biophys. Res. Com. 107, 75, 1982
39. G.C. Mills, J. Biol. Chem. 229,189, 1957
40. J.T. Rotruck, A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, W.G. Hoekstra, Science 179, 588, 1973
41, L. Flohe, W.A. Günzler, H.H. Schock, FEBS Lett. 32, 132, 1973
42. J.W. Forstrom, J.J. Zakowski, A.L. Tappel, Biochem. 17, 2639, 1978
43. W.A. Günzler, H. Vergin, I. Müller, L. Flohe, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1001, 1972
44. L. Flohe, G. Loschen, W.A. Günzler, E. Eichele, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 987, 1972
45. A. Grossmann and A. Wendel, Eur. J. Biochem. 135, 549, 1983
46. R.F. Burk, A.M. Mackinnon, F.R. Simon, Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 431, 1974
47. F. Ursini, M. Maiorino, M. Valente, L. Ferri, C. Gregolin, Biochem. Biophys. Acta 710, 197, 1982
48. M. Maiorino, F. Ursini, M. Leonelli, N. Finato, C. Gregolin, Biochem. Internat. 5, 575, 1982
49. H.J. Calvin, J. Exp. Zool. 204, 445, 1978
50. R. Reiter and A. Wendel, Biochem. Pharmacol. 32, 3063, 1983
51. R.Reiter and A. Wendel, Biochem. Pharmacol. 33, 1923, 1984

52. R.E. Serfass and H.E. Ganther, Nature 255, 640, 1975
53. S.S. Baker and H.J. Cohen, J. Immunol. 130, 2856,1983
54. R.W. Bryant and J.M. Bailey, Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 268, 1980
55. C. Gairola and H.-H. Tai, Biochem. Biophys. Res. Commun. 132, 397, 1985
56. R. Ladenstein, O. Epp, K. Bartels, A. Jones, R. Huber, A. Wendel, J. Mol. Biol. 134, 199, 1979
57. B. Ketterer, K.H. Tan and D.J. Meyer, In: Life Chemistry, Suppl. 2, A.M. Michelson, J.V. Bannister (eds.), EMBO Workshop, Rome, Italy 1983, Harwood Acad. Publ., pp. 386
58. T.C. Stadtman, Fund. Appl. Toxicol. 3, 420, 1983
59. R. Reiter and A. Wendel, Biochem. Pharmacol. 34, 2287, 1985
60. D.G. Brown and R.F. Burk, J. Nutr. 103, 102, 1973
61. R.F. Burk and P.E. Gregory, Arch. Biochem. Biophys. 213, 73, 1982
62. M.A. Motsenbocker and A.L. Tappel, Biochim. Biophys. Acta 719, 147, 1982
63. W.C. Hawkes, E.C. Wilhelmsen, A.L. Tappel, J. Inorg. Biochem. 23, 77, 1985
64. J.T. Deagan and Whanger, FASEB-Abstr. 1985
65. K. Schwarz, Fed. Proc. 20, 666, 1961
66. R.F. Burk, R. Whitney, H. Frank, W.N. Pearson, J. Nutr. 95, 420, 1968
67. C. Mitoma, H.S. Posner, H.C. Reitz, S. Udenfried, Arch. Biochem. Biophys. 61, 431, 1956
68. U.K. Laemmli, Nature 227, 680, 1970
69. G. Fairbanks, T.L. Steck, D.F.H. Wallach, Biochem. 10, 2606, 1971
70. T. Omura and R. Sato, J. Biol. Chem. 239, 2370, 1964

71. R.W. Estabrook and J. Werringloer, In: Meth. Enzymol. (W.B.Jakoby, ed.) Vol. 77, 212, 1981
72. V.U. Ullrich and P. Weber, Hoppe Seyler' Z. Physiol. Chem. 353, 1171, 1972
73. W.A. Günzler, H. Kremers, L. Flohe, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 444, 1974
74. A. Wendel, In: Meth. Enzymol. (W.B. Jakoby, ed.) Vol. 77, 325, 1981
75. W.H. Habig and W.B. Jakoby, In: Meth. Enzymol.(W.B. Jakoby, ed.) Vol. 77, 398, 1981
76. E.A. Boysle, L. J. Old, I. Chouroulinskov, Methods Med. Res. 10, 39, 1964
77. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall J. Biol. Chem. 193, 265, 1951
78. A.G. Gornall, C.D. Bardawill, M.M. David, J. Biol. Chem. 177, 751, 1949
79. R. Otter, unveröffentlicht
80. R.A. Lawrence and R.F. Burk, J. Nutr. 108, 211, 1978
81. Y.C. Awasthi, E. Beutler, K.S. Srivastava, J. Biol. Chem. 250, 5144, 1975
82. D.T.Y. Chiu, F.H. Stults, A.L. Tappel, Biochim. Biophys. Acta 455, 558, 1976
83. F.H. Stults, J.W. Forstrom. D.T.Y. Chiu, A.L. Tappel, Arch. Biochem. Biophys. 183, 490, 1977
84. R.A. Sunde, H.E. Ganther, W.G. Hoekstra, Fed. Proc. 37, 757 (Abstr.), 1979
85. R. Forward and R. Almog, J. Chromatogr. 330, 383,1985
86. J.J. Zakowski and A.L. Tappel, Biochim. Biophys. Acta 526, 65, 1978
87. M.A. Motsenbocker and A.L. Tappel, Biochim. Biophys. Acta 709, 160, 1982

88. W.C. Hawkes, D.E. Lyons, A.L. Tappel, Fed. Proc. 38, 820 (Abstr.), 1979
89. W.C. Hawkes and A.L. Tappel, Biochim. Biophys. Acta 739, 225, 1983
90. R.A. Sunde and W.G. Hoekstra, Nutr. Rev. 38, 265, 1980
91. M.A. Motsenbocker and A.L. Tappel, Fed. Proc. 42, 533 (Abstr.), 1983
92. P.D. Whanger, N.D. Peterson, P.H. Weswig, Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1031, 1973
93. M.A. Beilstein and P.D. Whanger, Biochem. Arch. 1, 153 1985
94. National Research Counsil. Recommended Dietary Allowances, Ninth Revised Edition, Nat. Acad. Sci., Washington D.C. 1980
95. V.R. Young, N. Engl. J. Med. 304, 1228, 1984
96. Keshan Disease Research Group, Chinese Med. J. 92, pp. 471 and 477, 1979
97. X. Chen, G. Yang, J. Chen, X. Chen, Z. Wen, K. Ge, Biol. Trace Element Res. 2, 91, 1980
98. M.A. Motsenbocker and A.L. Tappel, Fed. Proc. 42, 533 (Abstr.), 1983
99. J.M. Voigt and A.P. Autor, Fed. Proc. 42, 806 (Abstr.), 1983
100. O.A. Levander, V.C. Morris, D.J. Higgs, Biochem. Biohpys. Res. Commun. 58, 1047, 1974
101. R. Reiter, Dissertation, Universität Tübingen 1984
102. K. Decker, In: Seminars in Liver Disease, Vol 5., pp.175, 1985
103. C. N. Serhan, M. Hamberg, B. Samuelsson, Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 943, 1984
104. C.N. Serhan, M. Hamberg, B. Samuelsson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5335, 1984

105. B.J. Fitzsimmons, J. Adams, J.F. Evans, Y. Leblanc, J. Rokach, J. Biol. Chem. 260, 13008, 1985
106. M.G. Doni, G.L. Avventi, L. Bonadiman, G. Bonnaccorso, Amer. J. Physiol. 240, H 800, 1981
107. H. Kawaguchi, T. Ishibashi, Y. Imai, Lipids 17, 577, 1982
108. M.G. Doni, G. Bonaccorso, E. Piva, Haemostasis 13, 248, 1983
109. T. Masukawa, J. Goto, H. Iwata, Experimentia 39, 405, 1983
110. N.W. Schoene, V.C. Morris, O.A. Levander, Fed. Proc. 43, 477 (Abstr.), 1984
111. S. Moncada and J.R. Vane, N. Engl. J. Med. 300, 1142, 1979
112. R.S. Kent, S.L. Diedrich, A.R. Whorton, J. Clin. Invest. 72, 455, 1983
113. R.W. Egan, A.N. Tischler, E.M. Baptista, E.A. Ham, D.D. Soderman, P.H. Gale, In: Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research (B. Samuelsson, R. Paoletti, P. Ramwell, eds.) Vol. 11, pp.151, Raven Press, New York, 1983
114. B. Mannervik and K. Axelsson, Biochem J. 190, 125, 1980
115. H.P.T. Ammon and J. Steinke, Diabetes 21, 143,1972
116. B. Hellmann, L.-A. Idahl, J. Sehlin, I.-B. Täjedal, In: Diabetes (W.J. Malaisse and J. Priart, eds.), pp. 65, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1973
117. J.M. May and C. deHaen, J. Biol. Chem. 254, 9017, 1979
118. V.R. Lavis and R.H. Williams, J. Biol. Chem. 245, 23, 1970
119. F. Ursini, M. Maiorino, C. Gregolin, Biochim. Biophys. Acta 839, 62, 1985
120. W.A. Günzler, G.J. Steffens, A. Grossmann, S.-M.A. Kim, F. ötting, A. Wendel, L. Flohe, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 195, 1984

LEBENSLAUF

Ich wurde am 18.9.1950 in Istanbul geboren. In Batman und Adapazari/Türkei besuchte ich von 1956 bis 1961 die 5-jährige Grundschule und von 1962 bis 1970 in der Bundesrepublik Deutschland nacheinander das Ulrichsgymnasium in Norden, das Hölty-Gymnasium in Wunstorf/Hannover und das Gymnasium für Jungen in Wetzlar. Im Oktober 1970 machte ich in Wetzlar das Abitur. Im Wintersemester 1970/71 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen für das Studienfach Medizin. Im September 1971 legte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. Für das Sommersemester 1972 erhielt ich einen Studienplatz für Biochemie .Die Diplom-Vorprüfung legte ich im Oktober 1975 und den mündlichen Teil der Diplom-Hauptprüfung im Oktober 1982 ab. Von August 1982 bis Januar 1983 und von Mai bis Juni 1983 fertigte ich in der Arbeitsgruppe von Prof. U. Weber unter Anleitung von Priv. Doz. Dr. Hartter meine Diplomarbeit "Untersuchungen zur Leukotrien - Bildung durch isolierte Mischzellen aus dem Peritonealraum der Ratte" an. Zwischendurch (von Mitte März bis Mitte April 1983) leistete ich eine 2-monatige Grundausbildung in der türkischen Armee ab. Von Juli 1983 bis Januar 1986 fertigte ich unter Anleitung von Prof. Dr. Wendel am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen die vorliegende Dissertation "Cytosolische Selenoproteine der Mäuseleber" an.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

M. Arnold, E. Bayer, E. Betz, H. Bisswanger, V. Braun, U.Feine, K.G.Grell, F. Gönnenwein, J. Guglielmi, M. Hanack, E.Kallee, G. Krug, H. Mauser, D. Mecke, H. Metzner, F.P. Möhres, K.Mörike, H. Oberhammer, E. Pracht, H. Probst, H. Remmer, W. Rüdorff, W. Rundel, G. Staudt, B. Schwemmle, F.F. Seelig, M. Siess, W. Voelter, G. Weitzel, A. Wendel, U. Weser,H. Zähner, W. Zeil